Kristallstrukturen von F_{420}-abhängiger Alkohol-Dehydrogenase (Adf) und F_{420}-abhängiger Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (Mer)

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Stephan W. Aufhammer
aus
Bonn

Marburg/Lahn 2004

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden in der Zeit von Dezember 2001 bis August 2004 am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie in Marburg/Lahn unter der Leitung der Herren Professor Dr. R. K. Thauer und Dr. S. Shima und am Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt/Main unter der Leitung von Herrn PD Dr. Ulrich Ermler durchgeführt.

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität in Marburg als Dissertation angenommen am:

Tag der mündlichen Prüfung:

Erstgutachter: Prof. Dr. R. K. Thauer
Zweitgutachter: Prof. Dr. W. Buckel

Die in der Dissertation beschriebenen Ergebnisse wurden in folgenden Orginalpublikationen veröffentlicht:

Aufhammer SW, Warkentin E, Berk H, Shima S, Thauer RK, Ermler U (2004)

Coenzyme binding in F_{420}-dependent secondary alcohol dehydrogenase, a member of the bacterial luciferase family. *Structure* 12, 361-370.

Aufhammer SW, Warkentin E, Ermler U, Hagemeier CH, Thauer RK, Shima S

Crystal structure of Mer in complex with coenzyme F_{420}: Architecture of F_{420}/FMN-binding sites of enzymes within the non-prolyl *cis*-peptide containing bacterial luciferase subfamily. *Biochemistry*, eingereicht.

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

adf	Gen der Coenzym F_{420}-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase
Adf	Coenzym F_{420}-abhängige Alkohol-Dehydrogenase
CofF	Coenzym F_{420}-abhängige γ-F_{420}-2:α-L-Glutamat-Ligase
ESI-MALDI	Electrospray Ionization & Matrix-Assisted-Laser-Desorption-Ionization/Time of Flight
F0	7,8-Didemethyl-8-Hydroxy-5-Deazariboflavin
F_{390}	8-hydroxyguanyliertes bzw. 8-hydroxyadenyliertes Coenzym F_{420}
F_{420}	*N*-(*N*-L-Lactyl-γ-L-Glutamyl)-L-Glutamat-Phosphodiester-Derivat von 7,8-Didemethyl-8-Hydroxy-5-Deazariboflavin-5´Phosphat, Coenzym F_{420}
Fno	$F_{420}H_2$:NADP-Oxidoreduktase
Fpo	$F_{420}H_2$-Dehydrogenase Komplex
FprA	$F_{420}H_2$-Oxidase
Frd	Coenzym F_{420}-abhängige Formiat-Dehydrogenase
Frh	Coenzym F_{420}-reduzierende Hydrogenase
FtsA	Coenzym F_{390} Synthetase
8-HDF	8-Hydroxy-5-Deazariboflavin
H_4F	5,6,7,8-Tetrahydrofolat
H_4MPT	5,6,7,8-Tetrahydromethanopterin
LuxA	α-Untereinheit der bakteriellen Luciferase
Mer	Coenzym F_{420}-abhängige Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase
MetF	Methylentetrahydrofolat-Reduktase
MIR	Multiple Isomorphous Replacement
Mtd	Coenzym F_{420}-abhängige Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase
NpdC	Coenzym F_{420}-abhängige Hydridtransferase
NpdG	Coenzym F_{420}-abhängige NADP-Reduktase
NpdI	Coenzym F_{420}-abhängige Picrinsäure-Reduktase
Phr	DNA-Photolyase
TIM Barrel	$(\alpha/\beta)_8$-Konformation einer Tertiärstruktur
Upm	Umdrehungen pro Minute

Alle darüber hinaus verwendeten Abkürzungen entsprechen internationalen Standards wie sie in den Anweisungen für Autoren („Instructions to authors“) des *European Journal of Biochemistry* entnommen werden können.

I Zusammenfassung

Coenzym F_{420} ist ein 5´-Deazaflavin-Derivat, das in methanogenen Archaea in hohen Konzentrationen vorkommt und für die gelb-grüne Fluoreszenz dieser Organismen verantwortlich ist. Es ist an Hydrid-Transferase Reaktionen im Energie- und Baustoffwechsel dieser Organismen beteiligt. Bisher wurden acht F_{420}-abhängige Oxidoreduktasen in methanogenen Archaea gefunden, die alle *Si*-Seiten-spezifisch bezüglich des Hydrid-Transfers sind. Von den acht Enzymen zeigen zwei Sequenzverwandtschaft zur Enzymfamilie der bakteriellen Luciferase (LuxA). Es handelt sich hierbei um F_{420}-abhängige Alkohol-Dehydrogenase (Adf) und F_{420}-abhängige Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (Mer), die untereinander bis zu 26% sequenzverwandt sind. In der vorliegenden Arbeit wurden erstmals die Kristallstrukturen der Alkohol-Dehydrogenase Adf und der Reduktase Mer mit gebundenem Coenzym F_{420} ermittelt.

Die Struktur der F_{420}-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase (Adf) aus *Methanoculleus thermophilicus* wurde mit einem gebundenen F_{420}-Aceton Addukt bei einer Auflösung von 1,8 Å gelöst. Das Enzym liegt als Homodimer vor. Die Monomere besitzen eine $(\alpha/\beta)_8$-Faltung, bekannt als TIM-Barrel, und weisen eine nicht-Prolin-*cis*-Peptidbindung auf. Die Tertiärstruktur weicht von der Grundstruktur des TIM-Barrels durch zusätzliche Domänen mit Sekundärstrukturelementen ab, die als Insertions-Regionen bezeichnet werden. Insertions-Regionen bilden die Kontaktstelle für die Dimerisierung und sind an der Substratbindung beteiligt. Coenzym F_{420} bindet in einer Bindetasche, welche 15 Å tief von der Oberfläche bis in das Zentrum des Enzyms hineinreicht. Schwache Wechselwirkungen von F_{420} zu Amid-N und Carbonyl-O Atomen der Proteinhauptkette tragen wesentlich zu seiner Bindung bei. Die in Proteinen selten zu beobachtende nicht-Prolin-*cis*-Peptidbindung dient der Fixierung des Deazaflavin-Rings an seiner *Re*-Seite. Diese energetisch instabile *cis*-Bindung wird durch benachbarte, intramolekulare Wechselwirkungen stabilisiert. Der als Isoalloxazin-Ring bezeichnete Deazaflavin-Ring liegt in einer \`gebogenen´ Konformation vor und weicht um 27° von einer planaren Konformation ab. Der Aceton-Teil des gebundenen F_{420}-Aceton Addukts bindet kovalent am C5 auf der *Si*-Seite des Deazaflavin-Rings. Mit dieser Hilfe war es möglich, 2-Propanol in das aktive Zentrum des Enzyms zu modellieren. Reste, welche an der Bindung von

2-Propanol und am Hydridtransfer beteiligt sind, wurden identifiziert und zudem wurde ein katalytischer Mechanismus postuliert.

Die Kristallstruktur von F_{420}-abhängiger Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (Mer) aus *Methanosarcina barkeri* wurde mit gebundenem Coenzym F_{420} bei einer Auflösung von 2,6 Å ermittelt. Das Enzym liegt als Homotetramer vor. Mer-Monomere haben eine $(\alpha/\beta)_8$-Tertiärstruktur mit zusätzlichen Insertionsregionen. Innerhalb des aktiven Zentrums bindet F_{420} hauptsächlich über schwache Wechselwirkungen zu Amid-N und Carbonyl-O Atomen der Protein Hauptkette. Ausnahmen sind an der Bindung beteiligte Seitenketten von His36 und Lys161. Die nicht-Prolin-*cis*-Peptidbindung, an identischer Position zu Adf, fixiert den Deazaflavin-Ring. Der Isoalloxazin-Ring weist in Reduktase Mer die aus Alkohol-Dehydrogenase Adf bekannte gebogene Konformation auf. Ein unbekanntes Molekül bindet kovalent am C5 des Coenzyms. Anhand von Mer-Strukturvergleichen konnte eine F_{420}-bedingte Konformationsänderung in einer flexiblen Domäne einer Insertions-Region beobachtet werden. Zwischen zwei Insertionsregionen des TIM-Barrels bindet Polyethylenglykol, welches als Präzipitant im Kristallisationsansatz vorlag. Die unspezifische Bindung von Polyethylenglykol an einer potentiellen Substratbindestelle in Mer wird im abschließenden Teil dieser Arbeit diskutiert.

Aufgrund der Struktur der F_{420}-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase und der F_{420}-abhängigen Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase in Abwesenheit und in Gegenwart von F_{420} wird ein Katalysemechanismus für diese beiden Enzyme vorgeschlagen und F_{420} in das aktive Zentrum der strukturverwandten bakteriellen Luciferase modelliert. Abschließend wird die in der LuxA-Familie konservierte F_{420}- bzw. FMN-Bindestelle mit der in $F_{420}H_2$:NADP-Oxidoreduktase und 8-HDF-Photolyase verglichen, die weder untereinander noch mit der Luciferase-Familie Sequenzverwandtschaften zeigen.

Die Ergebnisse der vorliegenden Doktorarbeit sind in zwei Orginalarbeiten beschrieben, die den Ergebnisteil der Dissertation bilden.

II Einleitung

Coenzym F_{420} ist eine blaugrün-fluoreszierende Verbindung, die von Cheeseman *et al*. 1972 aus *Methanobacterium bryantii* Stamm M. o. H. erstmals isoliert, teilweise charakterisiert und aufgrund ihrer intensiven Absorption bei 420 nm als Faktor 420 (F_{420}) beschrieben wurde. Die Struktur wurde als *N*-(*N*-L-Lactyl-γ-L-Glutamyl)-L-Glutamat-Phosphodiester-Derivat von 7,8-Didemethyl-8-Hydroxy-5-Deazariboflavin-5´-Phosphat ermittelt (Eirich *et al*. 1978). Daraufhin wurde das Deazaflavin in allen methanogenen Archaea (Gorris & van der Drift 1994), in nicht-methanogenen Archaea (Lin & White, 1986), in zu den Bakterien gehörenden *Actinomyceten* (Eker *et al*. 1988), den Spezies von *Mycobacteria* (Naraoka *et al*. 1984), *Nocardia* (Daniels *et al.* 1985), *Anacystis* (Eker *et al*. 1990) und in der Grünalge *Scenedesmus acutus* (Eker *et al*. 1988) nachgewiesen. F_{420} kommt somit sowohl in der Domäne der Archaea als auch in Prokarya und Eukarya vor.

Obwohl Coenzym F_{420} mit Flavinmononukleotid (FMN) und Flavinadenindinukleotid (FAD) strukturell verwandt ist, weist das Deazaflavin mit dem Pyridinnukleotid NAD(P) vergleichbare Redoxeigenschaften auf (Walsh 1996) (Abbildung 1, Seite 5). Im Gegensatz zu Flavin-Coenzymen kann F_{420} nicht enzymatisch mit einem Elektron zu einem Semichinon-Radikal-Intermediat reduziert werden. F_{420} und NAD(P) sind reversible Hydridakzeptoren (H^-), wobei der enzymkatalysierte Hydridtransfer auf den Cofaktor stereospezifisch erfolgt. Das C5-Atom des Deazaflavin-Ringes ist dem C4-Atom der Pyridinnukleotide äquivalent. Allerdings unterscheiden sich die Redox-Cofaktoren bezüglich des Redoxpotentials. Das Potential des $F_{420}/F_{420}H_2$-Redoxpaares liegt mit –360 mV (Gloss & Hausinger, 1987) um 40 mV niedriger als das des NAD(P)+/NAD(P)H-Paares. Im Hinblick auf die Stereochemie des Hydridtransfers ist die Klasse der NAD(P)-spezifischen Oxidoreduktasen detailliert untersucht. In einer Zusammenstellung von 157 NAD(P)-abhängigen Dehydrogenasen, die hinsichtlich ihrer Stereospezifität an C4 des Nikotinamid-Ringes analysiert wurden, sind 77 Enzyme *Re*-Seiten-spezifisch und die 80 übrigen *Si*-Seiten-spezifisch (You 1985). Im Gegensatz dazu sind bislang erst acht F_{420}-abhängige Enzyme auf ihre Stereospezifität untersucht worden: Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (Klein *et al*. 1996), $F_{420}H_2$:NADP-Oxidoreduktase (Yamazaki *et al*. 1980; Kunow *et al*. 1993b), Hydrogenase (Jacobson & Walsh 1984;

Teshima *et al*. 1985; Yamazaki *et al*. 1985), Formiat-Dehydrogenase (Schauer *et al*. 1986), Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (Kunow *et al*. 1993a; Klein & Thauer 1995), $F_{420}H_2$:Dimethylnaphtochinon-Oxidoreductase (Kunow *et al*. 1993a) sowie die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (Kunow *et al*. 1993b) und Alkohol-Dehydrogenase (Klein *et al*. 1996). Alle Enzyme waren *Si*-Seiten-spezifisch.

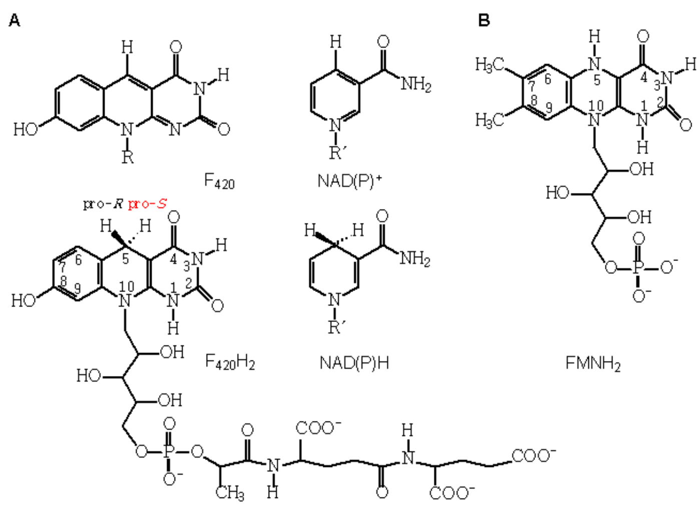


Abbildung 1: Struktur der oxidierten und reduzierten Form von Coenzym F_{420} und NAD(P) (A) und der reduzierten Form von FMN (B). Gezeigt ist die Aufsicht auf die *Re*-Seite der Cofaktoren. Die *pro-S* Position an C5 von Coenzym F_{420} ist rot hervorgehoben. Coenzym F_{420} besteht aus einem Deazaflavin-Ring (Isoalloxazin), einem Ribitol, einem Phosphat, einem Laktat und zwei oder mehreren Glutamaten (Eirich *et al*. 1978).

Die uniforme Stereospezifität ist überraschend, da unter den Flavoproteinen, von denen bekannt ist, dass sie die Reduktion von synthetischem 8-Hydroxy-5-Deaza-FAD, einer dem Cofaktor F_{420} funktionell analogen Verbindung, katalysieren, sowohl *Re*-Seiten-spezifische als auch *Si*-Seiten-spezifische Enzyme gefunden werden (Sumner & Matthews 1992). Die Frage, was die Stereospezifität F_{420}-abhängiger Enzyme bestimmt, bleibt bisher ungeklärt.

Bisher wurden zwölf F_{420}-abhängige Oxidoreduktasen beschrieben und drei F_{420}-abhängige Enzyme, die keine Oxidoreduktasen sind (Tabelle 1, Seite 7). Von den 15 Enzymen sind F_{420}-abhängige Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase

(Mer) (Ma & Thauer 1990b; Ma & Thauer 1990a; Ma & Thauer 1990c; te Brommelstroet *et al*. 1990; Ma *et al*. 1991) und F_{420}-abhängige Alkohol-Dehydrogenase (Adf) (Widdel & Wolfe 1989; Bleicher & Winter 1991) aus methanogenen Archaea, F_{420}-abhängige Picrinsäure-Reduktase (NpdI) und F_{420}-abgängige Hydrid-Transferase I (NpdC) aus *Rhodococcus* (Heiss *et al*. 2002), F_{420}-abhängige Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (Fgd) aus *Mycobacterium* (Purwantini & Daniels 1998) und eine F_{420}-abhängige Oxidoreduktase (LmbY) aus *Streptomyces* (Peschke *et al*. 1995) miteinander sequenzverwandt. Diese sechs Enzyme zeigen wiederum Verwandtschaft zur bakteriellen Luciferase (LuxA) (Baldwin & Ziegler 1992) (um 20%) und werden deshalb in der LuxA-Familie zusammengefasst .

Eine eigene Gruppe stellen auch der $F_{420}H_2$-Dehydrogenase Komplex (Fpo) (Bäumer *et al*. 1998), die F_{420}-reduzierende Hydrogenase (Frh) (Alex *et al*. 1990) und die F_{420}-abhängige Formiat-Dehydrogenase (Frd) (Schauer *et al*. 1986) aus methanogenen Archaea dar, deren F_{420}-bindende FAD-haltige Untereinheit FpoF, FrhB bzw. FrdB sequenzverwandt sind (Warkentin *et al*. 2001). Alle übrigen F_{420}-abhängigen Enzyme sind nicht untereinander sequenzverwandt (Tabelle 1, Seite 7). Das gilt für $F_{420}H_2$:NADP-Oxidoreduktase (Fno) aus Archaea und Bacteria (Yamazaki *et al*. 1980; Eirich & Dugger 1984; de Wit & Eker 1987; Eker *et al*. 1989; Kunow *et al*. 1993b; Heiss *et al*. 2002), für F_{420}-abhängige Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (Mtd) aus methanogenen Archaea (Klein & Thauer 1995), für Coenzym F_{390}-Synthetase (FtsA) aus *Methanothermobacter* (Vermeij *et al*. 1996) und γ-F_{420}-2:α-L-Glutamat-Ligase (CofF) aus *Methanococcus* (Li *et al*. 2003).

Eine Sonderstellung nimmt die 8-HDF-Photolyase (Phr) aus *Anacystis*, *Methanothermobacter* und *Halobacterium* ein (Kiener *et al*. 1989; Takao *et al*. 1989; Tamada *et al*. 1997), die F0 anstelle von F_{420} enthalten, während für alle übrigen der in Tabelle 1 aufgeführten Enzyme F_{420} ein Coenzym oder Substrat ist. F0 ist ein F_{420}-Derivat ohne die Phosphat-enthaltende Seitengruppe (Abbildung 1, Seite 5).

Die höchste Konzentration an F_{420} kommt in methanogenen Archaea vor. Das sind strikt anaerobe Mikroorganismen, die auf H_2 und CO_2, Formiat, Acetat,

Methanol, Methylaminen oder Alkoholen und CO_2 unter Bildung von Methan (CH_4) wachsen.

Tabelle 1: Verwandtschaft einzelner Coenzym F_{420}-abhängiger Enzyme . Mer, Adf, Fgd, NpdI, NpdC und LmbY sind untereinander sequenzähnlich und zeigen Sequenzverwandtschaft zur LuxA-Familie. F_{420}-bindende Untereinheiten FpoF, FrhB und FrdB zeigen untereinander sehr geringe Sequenzverwandschaft, doch könnten sogenannte `Cluster´ von konservierten Aminosäuren in der Primärstruktur auf eine gemeinsame Bindestelle hindeuten. Alle anderen Enzyme zeigen untereinander keine Sequenzverwandtschaft. Dies gilt für Fno, Mtd, FprA, FtsA, CofF und Phr. Enzyme, die nicht zur Klasse der Oxidoreduktasen gehören, sind grau unterlegt.

F_{420}-abhängige Enzyme	Abkürzung	Sequenz-identität[a]	Kristallstrukturen
Methylentetrahydro-methanopterin-Reduktase	Mer	100 %[b]	Mer aus *Methanothermobacter marburgensis* und aus *Methano-pyrus kandleri*[1], jeweils ohne F_{420} gebunden
Alkohol-Dehydrogenase	Adf	21 %	-
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Fgd	19 %	-
Picrinsäure-Reduktase	NpdI	23 %	-
Hydrid-Transferase I	NpdC	16 %	-
Oxidoreduktase	LmbY	20 %	-
$F_{420}H_2$-Dehydrogenase Komplex	FpoF	100 %[c]	-
Hydrogenase	FrhB	14 %	-
Formiat-Dehydrogenase	FrdB	12 %	-
$F_{420}H_2$:NADP Oxidoreduktase	Fno	-	Fno aus *Archaeoglobus fulgidus*[2] mit gebundenen NADP und F_{420}
Methylentetrahydromethan-opterin-Dehydrogenase	Mtd	-	Mtd aus *Methanopyrus kandleri*[3] ohne F_{420} gebunden
$F_{420}H_2$-Oxidase	FprA	-	-
Coenzym F_{390}-Synthetase	FtsA	-	-
γ-F_{420}-2:α-L-Glutamat-Ligase	CofF	-	-
8-HDF-Photolyase	Phr		Phr aus *Anacystis nidulans*[4] mit gebundenem FAD und F0

[a] bezogen auf die gesamte Primärstruktur, [b] Mer aus *Methanothermobacter marburgensis*, [c] FpoF aus *Methanosarcina mazei*.
[1] Shima et al, 2000; [2] Warkentin et al, 2001; [3] Hagemeier et al, 2003; [4] Tamada et al, 1997.

Abbildung 2 zeigt eine Übersicht der F_{420}-abhängigen Reduktions- und Oxidations-Reaktionen und der sie katalysierenden Enzyme im Stoffwechsel dieser Organismen.

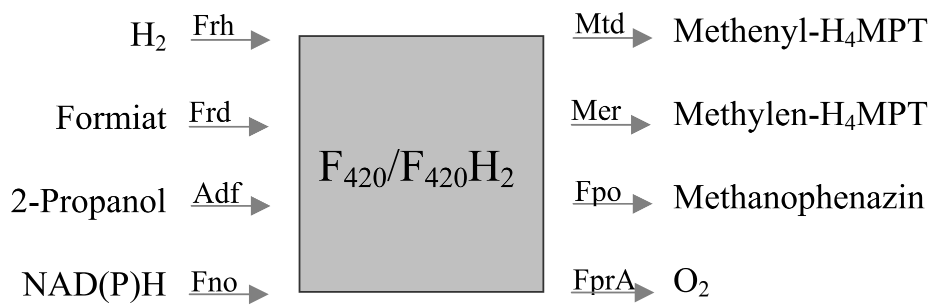


Abbildung 2: F_{420} reduzierende und oxidierende Reaktionen. Zur Reduktion von F_{420} dienen H_2, Formiat, 2-Propanol und NAD(P)H. Frh, F_{420}-abhängige Hydrogenase; Frd, F_{420}-abhängige Formiat-Dehydrogenase; Adf, F_{420}-abhängige Alkohol-Dehydrogenase; Fno, $F_{420}H_2$:NAD(P) Oxidoreduktase. Methenyl-H_4MPT, Methylen-H_4MPT, Methanophenazin und O_2 sind Elektronenakzeptoren, die an der Oxidation von $F_{420}H_2$ beteiligt sind. H_4MPT, Tertrahydromethanopterin; FprA, F_{420}-abhängige Oxidase; Mtd, Methylen-H_4MPT-Dehydrogenase; Mer, F_{420}-abhängige Methylen-H_4MPT-Reduktase; Fpo, $F_{420}H_2$-Dehydrogenase Komplex.

Von den acht aufgeführten Oxidoreduktasen wurden bisher drei bezüglich ihrer Kristallstruktur untersucht, F_{420}-abhängige Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (Mer) (Shima *et al*. 2000), $F_{420}H_2$:NADP-Oxidoreduktase (Fno) (Warkentin *et al*. 2001) und F_{420}-abhängige Methylentetrahydromethanopterin-Dehydrogenase (Mtd) (Hagemeier *et al*. 2003), die alle drei untereinander nicht verwandt sind. Nur im Falle von Fno gelang es bisher, eine Struktur mit F_{420} gebunden aufzuklären.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine solche Struktur auch für Mer zu erhalten, um unter anderem herauszufinden, warum alle F_{420}-abhängigen Oxidoreduktasen *Si*-Seiten-spezifisch bezüglich C5 des 5´Deazaflavins sind. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Ansätze für die Aufklärung der Coenzymbindestelle in Mer verfolgt. Zum einen wurde versucht, die Kristallstruktur der F_{420}-abhängigen Alkohol-Deyhdrogenase (Adf) aus *Methanoculleus*

thermophilicus zu ermitteln, da dieses Enzym nach Reinigung F_{420} gebunden enthält und mit Mer sequenzverwandt ist. Zum anderen wurde versucht, eine Kristallstruktur von Mer mit F_{420} gebunden aus *Methanosarcina barkeri* (Wachstums-temperaturoptimum von 37 °C) zu erhalten, in der Hoffung, dass das Enzym aus dem mesophilen Organsimus bei der Kristallisationstemperatur Coenzym F_{420} besser bindet als die bisher untersuchten Enzyme aus den thermophilen Organismen *Methanothermobacter marburgensis* und *Methanopyrus kandleri*, die Wachstumstemperaturoptima von 65 °C bzw. 95 °C haben.

Im Folgenden wird zusammengefasst, was über die Funktion und die Struktur von Adf und von Mer bekannt ist.

F_{420}-abhängige Alkohol-Deyhdrogenase (Adf) kann keiner bisher bekannten Alkohol-Deyhdrogenase-Gruppe zugeordnet werden und benötigt kein Zink für ihre katalytische Aktivität. F_{420}-abhängige Alkohol-Dehydrogenase wurde in früheren Arbeiten aus *Methanoculleus thermophilicus* und *Methanofollis liminatans* gereinigt und enzymkinetisch charakterisiert (Widdel & Wolfe 1989; Bleicher & Winter 1991). Adf katalysiert den Hydridtransfer von 2-Propanol stereoselektiv in die *pro-S*-Position am C5 von $F_{420}H_2$ (Klein *et al*. 1996) (Abbildung 3).

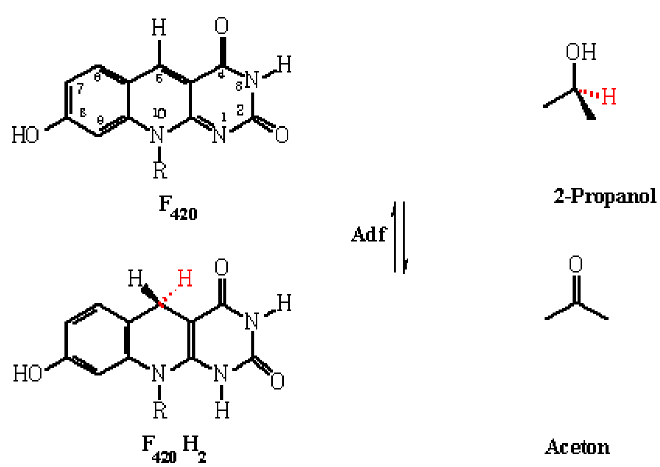


Abb. 3: Reaktion der F_{420}-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase (Adf). F_{420}, Coenzym F_{420}; Adf katalysiert den stereospezifischen Hydrid-Transfer von 2-Propanol in die *pro-S*-Position am C5 von $F_{420}H_2$.

Weitere sekundäre Alkohole wie 2-Butanol und 2-Pentanol werden von Adf mit verminderter Geschwindigkeit oxidiert und Ketone, wie Aceton, 2-Butanon und Cyclopentanon, reduziert. Dagegen können primäre Alkohole, Di- oder Polyole, Benzyl-Alkohole und sekundäre Alkohole mit mehr als fünf Kohlenstoffen nicht umgesetzt werden (Bleicher & Winter 1991). Adf liegt physiologisch als Homodimer vor und besteht nur aus einer Art von Untereinheit, mit einer errechneten molekularen Masse von 37,2 kDa. Das für das Enzym kodierende *adf*-Gen wurde kloniert und heterolog exprimiert, war aber unlöslich und inaktiv (Berk 1999). Die Gensequenz konnte Adf dennoch zugewiesen werden, da ein kleiner Anteil an heterolog exprimiertem Enzym löslich war und hohe Aktivität besaß. Die abgeleitete Aminosäuresequenz wurde in Proteinsequenz-Datenbanken mit anderen Enzymen verglichen und somit wurde eine Verwandtschaft zur Reduktase Mer und zur LuxA-Familie erkannt. Aufgrund der Bildung von \`inclusion-bodies´ bei heterologer Produktion musste Adf für die vorliegenden Untersuchungen aus *Methanoculleus thermophilicus* gereinigt werden.

F_{420}-abhängige Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (Mer) katalysiert die Reduktion von Methylentetrahydromethanopterin (Methylen-H_4MPT) mit $F_{420}H_2$ zu Methyltetrahydromethanopterin und F_{420}, einem essentiellen Schritt der Methanogenese (Abbildung 4, Seite 11). In diesem intermediären Schritt der CO_2-Reduktion zu CH_4 wird die an das Coenzym Tetrahydromethanopterin gebundene C1-Einheit von der Methylen- zur Methyl-Stufe reduziert. Die Kernstruktur dieses methanogenen C1-Carriers wird von einem Tetrahydropterin-Ringsystem gebildet, an dem ein Arylamin über eine Methylengruppe gebunden ist. An diese gekoppelt ist ein Ribitol, ein Ribose-5-Phosphat und ein Hydroxyglutarat. F_{420}-abhängige Methylen-tetrahydromethanopterin-Reduktasen konnten sowohl in methanogenen als auch in Sulfat-reduzierenden Archaea nachgewiesen werden und wurden umfassend charakterisiert (Ma & Thauer 1990a; Ma & Thauer 1990b; Ma & Thauer 1990c; te Brommelstroet *et al*. 1990; Ma *et al*. 1991). Zusätzliche Bedeutung hat Mer in der autotrophen CO_2-Fixierung, welche in Archaea über den modifizierten Acetyl-CoA-Weg (Ljungdahl-Wood-Weg) erfolgt, sowie der Methylgruppen-Oxidation bei Wachstum auf Methylgruppen-haltigen Substraten (Schmitz *et al*. 1991; Vorholt *et al*. 1995; Vorholt *et al*. 1997).

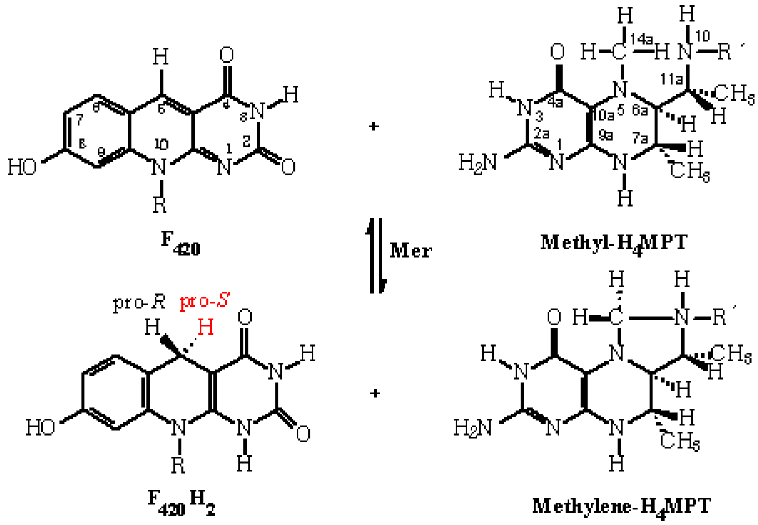


Abbildung 4: Reaktion der F_{420}-abhängigen Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (Mer). F_{420}, Coenzym F_{420}; H_4MPT, Tetrahydromethanopterin. Mer katalysiert die Reduktion von N^5,N^{10}-Methylentetrahydromethanopterin (Methylen-H_4MPT) mit $F_{420}H_2$ zu N^5-Methyltetrahydromethanopterin (Methyl-H_4MPT).

Das Enzym kommt im Zytoplasma vor und besteht nur aus einem Typ Untereinheit, die eine apparente molekulare Masse zwischen 35 und 40 kDa zeigt. Reduktase Mer besitzt keine prosthetische Gruppe und kinetische Daten deuten auf einen ternären Komplex-Mechanismus während der Reaktion hin.

Bislang wurden die Kristallstrukturen aus *Methanothermobacter marburgensis* und *Methanopyrus kandleri*, einem thermophilen und einem hyperthermophilen Archaeon, aufgeklärt (Shima *et al*. 2000). Die Monomere zeigen eine \`TIM-Barrel´ (Triose-Phosphat-Isomerase) Tertiärstruktur, welche als $(\alpha/\beta)_8$ bezeichnete Konfiguration eine alternierende Abfolge von je acht α-Helices und acht β-Faltblattstrukturen darstellt (Banner *et al*. 1975). Die Tertiärstruktur weist, abweichend von der Grundstruktur des TIM-Barrels, drei Domänen mit zusätzlichen Sekundärstrukturelementen auf, die als Insertions-Regionen 1 bis 3 bezeichnet werden. Insertions-Regionen 1 und 2 bilden die Kontaktstelle für die Multimerisierung. Den Insertions-Regionen 2 und 3, welche zusammen mit dem C-Terminus eine spaltförmige Tasche begrenzen, wurde eine Rolle in der Substratbindung zugesprochen. Die Faltung der Mer-Monomere zeigt Ähnlichkeit zur

Tertiärstruktur der NADP-abhängigen Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MetF) aus *Escherichia coli*, obwohl beide Enzyme keine signifikante Sequenzidentität miteinander aufweisen (Guenther *et al*. 1999) (Abbildung 5).

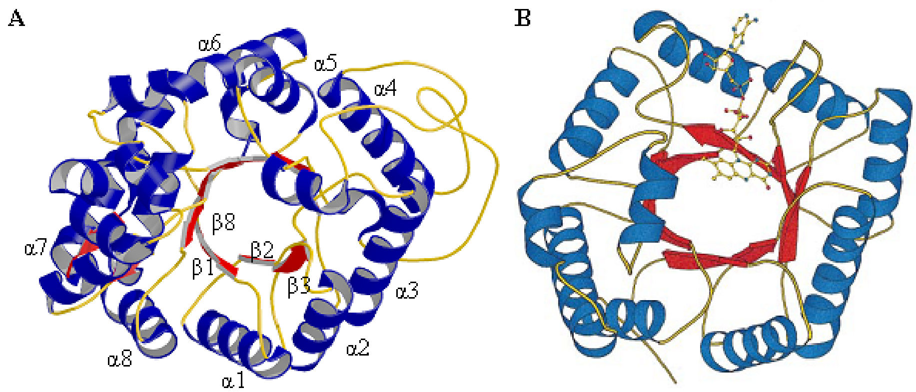


Abbildung 5: Tertiärstrukturen der F_{420}-abhängigen Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (Mer) aus *Methanopyrus kandleri* (Shima *et al*. 2000) (A) und der Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MetF) aus *Escherichia coli* mit gebundenem FAD (Guenther *et al*. 1999) (B). Das Monomer zeigt eine \`TIM-Barrel´ (Triose-Phosphat-Isomerase) Tertiärstruktur, welche als $(\alpha/\beta)_8$ bezeichnete Konfiguration eine alternierende Abfolge von je acht α-Helices (blau) und acht β-Faltblattstrukturen (rot) darstellt. Die aus der MetF-Kristallstruktur bekannte Bindestelle von FAD, der prosthetischen Gruppe in MetF, wurde für eine Vorhersage der unbekannten F_{420} Bindestelle in Mer genutzt.

MetF katalysiert eine zu Reduktase Mer analoge Reaktion, die Reduktion von Methylentetrahydrofolat mit NAD(P)H zu N^5-Methyltetrahydrofolat und $NAD(P)^+$ (Wohlfarth & Diekert 1991; Sheppard *et al*. 1999). Die aus der MetF-Kristallstruktur bekannte Bindestelle von FAD, der prosthetischen Gruppe in MetF, wurde für eine Vorhersage der unbekannten F_{420} Bindestelle in Mer genutzt (Shima *et al*. 2000).

In der Nähe der postulierten Coenzym-Bindestelle wurde eine nicht-Prolin-*cis*-Peptidbindung gefunden, welche in Proteinen sehr selten vorkommt (Abbildung 6, Seite 13). In Proteinstrukturen herrscht die *trans*-Peptidbindung vor, da *cis*-Peptidbindungen unweigerlich zu einer sterischen Abstoßung der Seitenreste von Aminosäuren und somit zu einer Destabilisierung der Faltung des Proteins führen.

Relativ häufig kommen sie aber in Peptidbindungen vor, in welchen die Iminosäure Prolin beteiligt ist. Wie aus Statistiken hervorgeht, erlaubt die Natur nicht-Prolin-*cis*-Peptidbindungen oft in funktionell wichtigen Regionen von Proteinen (Jabs *et al*. 1999).

Abbildung 6: Eine nicht-Prolin-*cis*-Peptidbindung im Vergleich mit einer *trans*-Peptidbindung. Die seltene *cis*-Peptidbindung verbindet Glycin und Isoleucin oder Valin in Reduktase Mer. Nicht-Prolin-*cis* Peptidbindungen sind im Vergleich mit einer *trans*-Peptidbindung energetisch ungünstiger und wirken destabilisierend auf die Faltung eines Proteins.

Um die Bindestelle von F_{420} in Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase zu ermitteln, wurde gereinigtes Enzym aus den oben genannten thermophilen Archaea mit Substraten kokristallisiert, doch führten diese Ansätze zu Kristallen, in welchen kein Coenzym enthalten war (Shima *et al*. 2000) oder zu Kristallen, deren Datensätze nicht auszuwerten waren.

III Material und Methoden

1. Material

Chemikalien und Biochemikalien. Die Crystal-Screen-Kits 1 und 2 wurden von Hampton Research (Aliso Viejo, CA/USA) geliefert. Die Coenzyme F_{420} und 5,6,7,8-Tetrahydromethanopterin (H_4MPT) wurden aus *Methanothermobacter marburgensis* (DSMZ 2133) isoliert (Schönheit *et al*. 1980; Breitung *et al*. 1992) und freundlicherweise von Herrn Reinhard Böcher und Frau Johanna Moll (MPI, Marburg) zur weiteren Reinigung zur Verfügung gestellt.

Schweratomverbindungen. Folgende Verbindungen wurden für die Herstellung von Schweratomderivaten der Proteinkristalle verwendet:

Tabelle 2: Schweratomverbindungen. Für die Herstellung von Schweratomderivaten wurden die Proteinkristalle in Reservoirlösung eingelegt. Dieser Lösung wurden die Schweratomverbindungen in Konzentrationen von 0,1–3 mM zugesetzt. Die Methode wird unter Punkt 4.2 beschrieben

Ethymercuriphosphat	Hampton Research, (Aliso Viejo, CA/USA)
Ethylmercurithiosalicylat (Thimerosal)	Serva (Heidelberg)
Di-µ-iodobis(en)diplatin(II)nitrat (PIP)	ABCR GmbH (Karlsruhe)
$Hg(Ac)_2$	Alfa Aesar Johnson Matthey (Karlsruhe)
$Hg_2(Ac)_2$	Anatrace, Inc. (Maumee, OH/USA)
$KAu(III)Cl_4$	Alfa Aesar Johnson Matthey (Karlsruhe)
$KAu(I)(CN)_2$	Alfa Aesar Johnson Matthey (Karlsruhe)
K_2PtCl_4	Alfa Aesar Johnson Matthey (Karlsruhe)
Mersalylsäure	Sigma (Taufkirchen)
Methylmercuryacetat	Hampton Research (Aliso Viejo, CA/USA)
Pt(II)(terpy)chlorid	Aldrich (Taufkirchen)
Trimethylbleiacetat	Alfa Aesar Johnson Matthey (Karlsruhe)
Uranchlorid	Alfa Aesar Johnson Matthey (Karlsruhe)

Gase. Die verwendeten Gase N_2 (99,993%), H_2/CO_2 (80%/20%), N_2/CO_2 (90%/20%) wurden von der Firma Messer-Griesheim (Düsseldorf) bezogen.

FPLC Säulen und Säulenmaterialien. Die Enzyme wurden mit Hilfe folgender FPLC-Säulen gereinigt: Phenyl Sepharose (HiLoad 26/10), Blue Sepharose CL-6B, Resource Q, Superdex 200 HR 10/30, Hydroxyapatit. Das Hydroxyapatit-Säulenmaterial stammt von der Firma BioRad (München), alle anderen Materialien von der Firma Amersham Biosciences (Freiburg).

Instrumente und Geräte. Arbeiten unter Sauerstoffausschluss wurden in Anaerobenzelten von Coy (Michigan, USA) durchgeführt. In diesen wurde O_2 kontinuierlich an einem Palladium-Katalysator (BASF, Ludwigshafen) reduziert und H_2O der Zeltatmosphäre mittels Silica Gel Orange (Roth, Karlsruhe) entzogen. Das FPLC-System stammt von Amersham Biosciences (Freiburg) und das HPLC-System von Sykam (Fürstenfeldbruck). Für die Betrachtung von anaerob-gewachsenen Proteinkristallen wurde ein Binokkular (Zeiss, Jena) mit Kameraaufsatz und Monitor verwendet.

2. Kultivierung der verwendeten methanogenen Archaea

Methanoculleus thermophilicus (DSMZ 3915), *Methanothermobacter marburgensis* (DSMZ 2133) und *Methanosarcina barkeri* (DSMZ 804) wurden von der deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig) bezogen.

Methanoculleus thermophilicus. Das Medium für die Zellzucht von *M. thermophilicus* ist in Tabelle 3 zusammengestellt (Medium 1) (Widdel 1986). Die in Tabelle 3 (Seite 16) aufgeführten Medien wurden in Flaschen mit 2 l Volumen in der Schleuse eines Anaerobenzelts entgast. In dem Zelt wurden $Na_2S \cdot 9\ H_2O$ und L-Cystein/HCl $\cdot$ H_2O zugesetzt. Die mit Gummistopfen verschlossenen Flaschen wurden mit einer H_2/CO_2-Atmosphäre mit 0,3 bar Überdruck begast und autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurden die Medien mit 10 ml Vitaminlösung und anaerobisertem 2-Propanol versetzt.

Medium 1

Komponente	Menge
Salzlösung	200 ml
Spurenelementlösung I	10 ml
Spurenelementlösung II	1 ml
Vitaminlösung	10 ml
$NaHCO_3$	5 g
Na-Acetat · H_2O	500 mg
L-Cystein/HCl · H_2O	140 mg
Na_2S · 9 H_2O	280 mg
2-Propanol	2 ml

Die Komponenten wurden gelöst, mit 10 M HCl auf pH 7 eingestellt und mit H_20 auf 1 l aufgefüllt

Tabelle 3. Zusammensetzung des Mediums für die Kultivierung von *Methanoculleus thermophilicus*. Die Zusammensetzung der Salzlösung, der Spurenelementlösungen I und II sowie der Vitaminlösung ist in den Tabellen 4 und 5 aufgeführt.

Tabelle 4. Zusammensetzung der Spurenelementlösungen. Die Lagerung der Lösungen erfolgte aerob bei –20 °C.

Spurenelementlösung I

Komponente	Menge
Nitriloessigsäure	1500 mg
pH mit KOH auf 6,5 einstellen	
$MnSO_4$ · H_2O	500 mg
H_3BO_3	10 mg
$FeSO_4$ · 7 H_2O	150 mg
$NiCl_2$ · 6 H_2O	25 mg
$CuSO_4$ · 5 H_2O	10 mg
$CoCl_2$ · 6 H_2O	200 mg
$ZnSO_4$ · 7 H_2O	100 mg
$AlCl_3$ · 6 H_2O	10 mg
ad 1 l H_2O	

Spurenelementlösung II

Komponente	Menge
Na_2SeO_3 · 5 H_2O	30 mg
Na_2WO_4 · 2 H_2O	100 mg
Na_2MO_4 · 2 H_2O	10 mg
ad 1 l H_2O	

Kulturen von *M. thermophilicus* konnten wegen der auftretenden Scherkräfte nicht schüttelnd inkubiert werden. Daher enthielten die Kulturgefäße einen Magnetrührstab, der eine stehende Inkubation auf einem Magnetrührer ermöglichte. Die Rührgeschwindigkeit wurde so eingestellt, dass sich keine Gasblasen bildeten. *M. thermophilicus* wurde bei 55 °C unter H_2/CO_2 (1 bar Überdruck) in Medium 1 für

11 Tage kultiviert. In dieser Zeit wurde verbrauchtes H_2/CO_2 täglich nachgeführt. Am 7. Inkubationstag wurden 3 ml 2-Propanol (100% v/v) zugesetzt (Endkonzentration 0,5% v/v). Um die Verstoffwechselung von 2-Propanol zu induzieren, wurde die Gasphase gegen N_2/CO_2 ausgetauscht und nachfolgend auf eine weitere Begasung mit H_2/CO_2 verzichtet.

Tabelle 5. Zusammensetzung der Salz- und Vitaminlösung. Die Salzlösung wurde bei 4 °C aerob gelagert. Die Vitaminlösung wurde für 12 Stunden in einem Anaerobenzelt gerührt, anschliessend sterilfiltriert und bei –20 °C anaerob unter einer N_2-Atmosphäre (0,5 bar) gelagert.

Salzlösung		**Vitaminlösung**	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
NH_4Cl	2 g	Biotin	2 mg
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0,35 g	Folsäure	2 mg
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,45 g	Pyridoxin-HCl	10 mg
NaCl	5 g	Thiamin-HCl	5 mg
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,5 g	Riboflavin	5 mg
KCl	2,5 g	Nicotinsäure	5 mg
$MgSO_4 \cdot 7\ H_2O$	2 g	D,L-Calcium-Panthotenat	5 mg
0,2% (w / v) Resazurin	0,5 ml	Hydroxycobalamin (B_{12})	0,1 mg
ad 1 l H_2O		p-Aminobenzoesäure	5 mg
		Liponsäure	5 mg
		ad 1 l H_2O	

***Methanothermobacter marburgensis*.** Kulturen von *M. marburgensis* wurden unter strikt anaeroben Bedingungen auf einem Mineralsalzmedium (Medium 2 in Tabelle 6, Seite 18) mit einem Gasgemisch aus 80% H_2/20% CO_2 als Energie- und Kohlenstoffquelle kultiviert (Schönheit *et al*. 1980). Die Kulturen wurden in Glasfermentern (New Brunswick, Michigan) mit einem Gesamtvolumen von 14 l in 10 l Medium bei 65 °C gezogen. Die Gasflussrate betrug 1000 ml/min. Dem Gasgemisch wurde als Reduktionsmittel und Schwefelquelle 0,1% H_2S zugesetzt. Das Medium wurde mit 1200 Upm gerührt. Nach ca. 1 h, in der das Medium durch das Begasen mit 80% H_2/20% CO_2/0,1% H_2S bei 65 °C anaerobisiert wurde, wurde der Fermenter auf eine optische Dichte von ungefähr ΔOD_{578} = 0,5 mit einer frischen, in der spät-exponentiellen Phase geernteten Vorkultur inokuliert. Nach Erreichen

einer ΔOD_{578} von 4,5 – 5 wurden die Kulturen innerhalb von 20 min auf ca. 10 °C abgekühlt und anschließend mit Hilfe einer Durchflusszentrifuge (Hettich, Contrifuge 17 RS) geerntet.

Tabelle 6. Zusammensetzung des Mediums für *Methanothermobacter marburgensis*. Das Medium wurde aerob angesetzt und durch Begasen mit 80% H_2/20% CO_2/0,1% H_2S bei 65 °C anaerobisiert.

Medium 2		**Spurenelementlösung**	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
NH_4Cl	27,5 g	Nitriloessigsäure	30 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	90 g	H_20	2 g
Na_2CO_3	33 g	pH mit KOH auf 6,5 einstellen	10 g
0,2% (w/v) Resazurin	0,5 ml	$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	40 g
Spurenelementlösung	10 ml	$FeCl_2 \cdot 4\ H_2O$	10 g
ad 10 l H_2O		$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,2 g
		$NaMoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,2 g
		$NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$	1,2 g
		ad 1 l H_20	

Methanosarcina barkeri. Das Medium (Medium 3 in Tabelle 7, Seite 19) wurde unter aeroben Bedingungen hergestellt, dann in der Schleuse eines Anaerobenzeltes entgast und schließlich unter 95% N_2/5% H_2-Atmosphäre mit Cystein (140 mg/l) und $Na_2S \cdot 9\ H_20$ (280 mg/l) als Reduktionsmittel versetzt. Nach dem Ausschleusen der Flaschen (verschlossen mit Gummistopfen und Schraubdeckel-Verschlusskappen) wurde die Gasphase gegen 100% N_2 ausgetauscht und das Medium durch Autoklavieren sterilisiert. Das Medium wurde mit 5% einer Vorkultur von *M. barkeri* angeimpft, die sich noch in der exponentiellen Phase befand. Darauf erfolgte die Inkubation im Dunkeln. Die Kultivierung von *M. barkeri*, Stamm Fusaro, mit Methanol (250 mM) als Energiesubstrat erfolgte bei 37 °C nach den Angaben von Karrasch *et al*. 1989. Die Zellen wurden in 2 l-Glasflaschen (Schott, Mainz), die 1 l Medium enthielten, oder in 10 l-Glasflaschen, die 10 l Medium enthielten, gezogen. Die Zellernte erfolgte in der spät-exponentiellen Phase unter strikt anaeroben Bedingungen bei 4 °C mit einer Durchflusszentrifuge bei 15000 Upm. Die geernteten Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung unter 0,5 bar Überdruck H_2 bei –20 °C aufbewahrt.

Tabelle 7. Zusammensetzung des Mediums für *Methanosarcina barkeri*. Die Spurenelement-Zusammensetzung für Medium 3 ist angegeben. Die Vitaminlösung entspricht den Angaben von Tabelle 5, Seite 17.

Medium 3		**Spurenelementlösung**	
Komponente	Menge	Komponente	Menge
Imidazol	2,7 g	Titriplex I	1,5 g
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	0,07 g	in 500 ml H_2O lösen	
$Na_2HPO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,09 g	pH mit HCl auf 6,5 eingestellt	
In 0,5 l H_20 lösen,		$MnSO_4$	0,5 g
pH mit HCl auf 6,5 einstellen		$FeSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,1 g
$CaCl_2 \cdot 2\ H_2O$	0,25 g	$CoCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,1 g
$MgCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,4 g	$ZnSO_4 \cdot 7\ H_2O$	0,1 g
NH_4Cl	0,5 g	$CuSO_4 \cdot 5\ H_2O$	0,01 g
KCl	0,4 g	$AlCl_3 \cdot 6\ H_2O$	0,01 g
NaCl	2,0 g	H_3BO_3	0,01 g
Spurenelementlösung	10 ml	$Na_2MoO_4 \cdot 2\ H_2O$	0,01 g
Vitaminlösung	10 ml	$NiCl_2 \cdot 6\ H_2O$	0,03 g
0,2% (w/v) Resazurin	0,2 ml	$NaHSeO_3$	0,015 g
Methanol	10 ml	pH mit KOH auf 7,0 einstellen	
ad 1 l H_2O		ad 1 l H_2O	
nach Anaerobisieren zugeben:			
L-Cystein-HCl	0,14 g		
$Na_2S \cdot 9\ H_20$	0,28 g		

3. Reinigung der untersuchten F_{420}-abhängigen Enzyme

3.1 Reinigung und Analyse von Adf und Mer

Herstellung von Zellextrakten. Die Zellen aus den Kulturen der Archaea wurden anaerob in verschließbaren 500 ml Polycarbonat-Zentrifugenbechern (Nalgene, Rochester, NJ/USA) bei 4000 x g für 30 min bei 4 °C abzentrifugiert und in 50 mM Bis-Tris/HCl, pH 5,8 (*M. thermophilicus*) bzw. in 50 mM Tris/HCl, pH 7,6 (*M. marburgensis* und *M. barkeri*) aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte unter anaeroben Bedingungen bei einem Druck von 120 Mpa mit Hilfe einer French-Pressure-Zelle (American Instruments Company, Silver Spring, MD/USA). Nach fünfmaliger Passage wurden die auf diese Weise aufgeschlossenen Zellen in einem

Aaerobenzelt in 5 ml Polycarbonat-Zentrifugenröhrchen überführt und bei 27000 x *g* (30 min) zentrifugiert, um noch intakte Zellen und Zelltrümmer abzutrennen. Der Überstand, im Folgenden als Zellextrakt bezeichnet, wurde in anaerobe Serumflaschen gefüllt, um daraus im direkten Anschluß das Enzym zu reinigen.

Reinigung der F_{420}-abhängigen Alkohol-Deyhdrogenase. Für die Reinigung wurden alle verwendeten Puffer mit 15 mM Mercaptoethanol versetzt. Die F_{420}-abhängige Alkohol-Dehydrogenase wurde unter anaeroben Bedingungen aus 1,5-2 g Feuchtzellen (3 l Kulturmedium, ΔOD_{578}=0,2) gereinigt. Nach der Zentrifugation (30 min, 4 °C, 4000 x *g*) wurden die Zellen in 18 ml 50 mM Bis-Tris/HCl-Puffer, pH 5,8 aufgenommen. Der Zellaufschluß erfolgte wie beschrieben. Um Membrananteile abzutrennen, wurde der Zellextrakt nachfolgend für eine Stunde bei 130000 x *g* zentrifugiert. Der Ultrazentrifugationsüberstand wurde in der Anaerobenkammer tropfenweise mit gesättigter $(NH_4)_2SO_4$-Lösung (in 50 mM Tris/HCl, pH 7,6) versetzt und unter ständigem Rühren eine Endkonzentration von 60% (bezogen auf eine gesättigte $(NH_4)_2SO_4$-Lösung) eingestellt. Nach 30 minütigem Rühren wurde präzipitiertes Protein durch Zentrifugation (30 min) bei 27000 x g entfernt. Der erhaltene Überstand wurde auf eine mit 2 M $(NH_4)_2SO_4$ in 50 mM Tris/HCl, pH 7,6 äquilibrierte Phenyl-Sepharose-Säule (HiLoad 26/10) aufgetragen. Die Säule wurde mit 50 ml des Äquilibrierungspuffers gewaschen und gebundenes Protein durch einen fallenden $(NH_4)_2SO_4$-Gradienten (in 50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 2 M bis 0 M in 200 ml) eluiert. Es wurden Fraktionen von je 8 ml gesammelt. Die Hauptaktivität der F_{420}-abhängigen Alkohol-Deyhdrogenase eluierte in 5 Fraktionen bei einer $(NH_4)_2SO_4$-Konzentration zwischen 1 M und 0,7 M. Diese Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (30 kDa-Membran) unter Verwendung einer Amicon und einer Centricon ankonzentriert.

Stabilisierung der F_{420}-abhängigen Alkohol-Deyhdrogenase. Da gereinigte Alkohol-Dehydrogenase (12 mg/ml), bei –20 °C oder 4 °C, aerob oder anaerob in 10 mM MOPS, pH 7 gelagert, Präzipitationen aufwies, gebundenes F_{420} freisetzte (über ESI-MALDI-Analyse zusammen mit Dr. Steinbach analysiert) und einen hohen Aktivitätsverlust zeigte, wurden unterschiedliche Puffer für die Lagerung des Enzyms getestet (Bleicher & Winter 1991): (1a) 40 mM Kaliumphosphat, pH 7, 200 mM Na_2SO4, 10 mM 2-Propanol; (2a) 40 mM Kaliumphosphat, pH 7; 200 mM Na_2SO_4;

(3a) 40 mM Kaliumphosphat, pH 7; (4a) 50 mM Tris, pH 7,6; 400 mM $(NH_4)_2SO_4$, 10 mM 2-Propanol; (5a) 50 mM Tris, pH 7,6; 400 mM $(NH_4)_2SO_4$; (6a) 10 mM MOPS, pH 7, 200 mM NaCl, 10 mM 2-Propanol; (7a) 10 mM MOPS, pH 7, 200 mM NaCl; (8a) 100 mM Succinat, pH 4, 3 M NaCl, 10 mM 2-Propanol; (9a) 100 mM Succinat, pH 4, 3 M NaCl. Parallel wurde jeder Puffer mit einem Zusatz an 15 mM Mercaptoethanol angesetzt. Puffer 1b (Puffer 1a mit Mercaptoethanol) ewies sich als stabilisierend, da in ihm gelöstes Enzym, im Vergleich zu den anderen Puffern, den geringsten Verlust an spezischer Aktivität verzeichnen konnte. Präzipitatbildung wurde durch den stabilisierenden Effekt ebenfalls verhindert. Daraufhin wurde die Alkohol-Deyhdrogenase nach jeder Reinigung mit Puffer 1b gewaschen, auf 12 mg/ml ankonzentriert und bis zur weiteren Verwendung, bei 4 °C bis zu 10 Tagen, anearob gelagert.

Reinigung der F_{420}-abhängigen Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase. Das Enzym wurde unter anaeroben Bedingungen aus 8,5 g Feuchtzellen gereinigt. Die bei –20 °C gelagerten Zellen wurden auf Eis aufgetaut und in 30 ml 50 mM Tris/HCl, pH 7,7 mit einem Magnetrührstab auf einem Magnetrührer für 30 min resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte wie beschrieben. Um Membranteile abzutrennen wurde der Zellextrakt für 30 min bei 130000 x *g* zentrifugiert. Der Ultrazentrifugationsüberstand wurde anschließend filtriert (Porengröße 0,45 µm). Das Filtrat wurde auf eine mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,6 gewaschene Blue-Sepharose Cl-6B-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 120 ml des Äquilibrierungspuffers gewaschen. Das Protein wurde durch einen steigenden KCl-Stufen-Gradienten (in 50 mM Tris/HCl, pH 7,6) eluiert: 0,2 M KCl 120 ml, 0,4 M KCl 120 ml, 0,6 M KCl 120 ml, 0,8 M KCl 120 ml, 1,0 M und 2,0 M KCl 120 ml. Es wurden Fraktionen von je 8 ml gesammelt. Die Hauptaktivität der F_{420}-abhängigen Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase eluierte bei einer Konzentration von 0,6 M KCl. Vereinigte Fraktionen wurden mit Hilfe einer Amicon-Rührzelle ankonzentriert und mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,6 gewaschen. Da sich während dieses Prozesses weißes Präzipitat bildete, wurde das Konzentrat häufig filtriert (Porengröße 0,45 µm), um ein Verstopfen der nachfolgenden Säule zu verhindern. Da das Filtrieren bei jedem Ankonzentrieren des Enzyms notwendig war, ging ein großer Anteil an Reduktase Mer verlohren. Das Filtrat wurde auf eine mit 50 mM Tris/HCl, pH 7,6 gewaschene Resource Q-Säule aufgetragen. Das Enzym wurde

durch einen steigenden KCl-Gradienten (in 50 mM Tris/HCl, pH 7,6; 0 M bis 0,5 M in 200 ml) von der Säule gewaschen. Es wurden Fraktionen von je 4 ml gesammelt. Die Reduktase Mer-Aktivität eluierte in 8 Fraktionen von 0,1 – 0,2 M KCl. Diese wurden ankonzentriert und mit 30 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6 gewaschen. Das Konzentrat wurde auf eine mit 30 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6 gewaschene Hydroxyapatit-Säule aufgetragen. Die Säule wurde mit 30 ml des Äquilibrierungspuffers gewaschen. Das Protein wurde durch einen steigenden Kaliumphosphat-Gradienten eluiert (30 bis 500 mM Kaliumphosphat, 200 ml). Es wurden Fraktionen von je 4 ml gesammelt. Gereinigtes Enzym eluierte bei 500 mM Kaliumphosphat in 4 Fraktionen. Die Reinigung von Reduktase Mer aus *M. barkeri* mit Hilfe einer Superdex 200-Säule war nicht möglich, da das Enzym mit weiteren Verunreinigungen aggregierte und die Säule diese nicht zu trennen vermochte.

Protein-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen. Zur Bestimmung der Expression von Enzymen und zur Reinheitskontrolle von Enzympräparationen wurde das Prinzip der denaturierenden Gelelektrophorese eingesetzt (Laemmli 1970). Die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde in einer BioRad-Elektrophorese-Apparatur (MiniProtean II, Biorad, München) durchgeführt. Die Zusammensetzung der 13%igen Gele ist in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8. Zusammensetzung der SDS-Polyacrylamid-Gele

Lösung	Trenngel (12,8%ig)	Sammelgel (7,9%ig)
1,5 M Tris/HCl pH, 8,8	4,5 ml	-
0,5 M Tris/HCl, pH 6,8, 1% SDS	-	1,2
Destilliertes Wasser	2,8 ml	4,3 ml
Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1) (40%ig)	3,5 ml	1,4 ml
TEMED (100%ig)	7,5 µl	5 µl
APS (10%ig)	30 µl	60 µl

3.2 Bestimmung von Enzymaktivitäten und Proteingehalt

Bestimmung von Enzymaktivitäten. Photometrische Tests wurden in Küvetten (1 cm Schichtdicke; 1,5 ml Volumen) mit einem Hitachi-Spektralphotometer U-1000 (Hitachi, Tokio, Japan) durchgeführt. Die Küvetten wurden mit Butylstopfen

verschlossen und durch mehrmaliges Evakuieren und Begasen mit N_2 (150 kPa) anaerobisiert. Die Testkomponenten wurden als anaerobe Lösungen mit Hilfe von Unimetrics-Mikroliterspritzen (Macharey-Nagel, Düren) zugegeben. Ein Unit Enzymaktivität entspricht 1 µmol umgesetztem Substrat pro min.

F_{420}-abhängige Alkohol-Dehydrogenase. Der Assay wurde bei 40 °C in 700 µl 120 mM Kaliumphosphat-Puffer pH 6,0 durchgeführt. Der Ansatz enthielt 30 µM F_{420} und 130 mM 2-Propanol. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 12-50 µg Zellextrakt oder 0,5-10 µg gereinigtem Enzym gestartet. Die Abnahme der Extinktion wurde bei 401 nm verfolgt (ε_{401} von F_{420} = 25,9 $mM^{-1}cm^{-1}$) (DiMarco *et al*. 1990).

F_{420}-abhängige Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase. Der Assay wurde bei 55 °C in 700 µl 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,6 durchgeführt (Ma & Thauer 1990). Der Ansatz enthielt 16 µM F_{420}. Um das Coenzym zu reduzieren, wurde $Na_2S_2O_4$ bis zu einer Konzentration von 1,7 mM hinzugegeben und 5 min gewartet. Die Reduktion von F_{420} wurde bei 420 nm Wellenlänge verfolgt. Danach reagierte H_4MPT (14,2 uM) bei einer Konzentration von 15,4 mM Formaldehyd zu Methylen-H_4MPT. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 12-50 µg Zellextrakt oder von 0,5-10 µg gereinigtem Enzym gestartet. Die $F_{420}H_2$-Oxidation wurde bei 401 nm verfolgt.

Konzentrationsbestimmung von Proteinen. Die Proteinkonzentration wurde mit der Methode nach Bradford (Bradford 1976) unter Verwendung einer kommerziell erhältlichen Reagenzlösung (Biorad, München) bestimmt. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin.

3.3 HPLC-Reinigung von F_{420} und Methylentetrahydromethanopterin

Reinigung von Methylentetrahydromethanopterin. Um Methylen-H_4MPT herzustellen, wurden 20 µl 600 mM Formaldehyd in 120 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6 zu 400 µl in 120 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6 gelöstem H_4MPT (5 mM) zugegeben. Es wurden 50 – 90 µl von gelöstem Methylen-H_4MPT auf eine Synergi RP1 (Phenomex, Aschaffenburg) Umkehrphase-Säule (250 mm x 4,6 mm, Partikelgröße 4 µm) aufgetragen, die zuvor in 0,1% Formiat (pH 3) äquilibriert wurde. Eluiert wurde mit 100% Methanol in einem linearen Gradienten (2,2% /min). Die

Flussrate wurde auf 1 ml/min eingestellt. Vom Eluat wurde durch ein in das Gerät integriertes Diodenarray-Photometer (S3210, Sykam, Fürstenfeldbruck) ein UV/VIS-Spektrum von 250 – 450 nm aufgenommen. Methylen-H_4MPT wurde anhand seiner peaks bei 220 nm, 250 nm und 287 nm identifiziert. Die Auswertung der Daten erfolgte durch die Chromstar-Software (SCPA GmbH, Stuhr). Gereinigtes Methylen-H_4MPT wurde anschließend lyophilisert und unter einer N_2-Gasatmosphäre bei -20 °C gelagert.

Reinigung von F_{420}. Lyophilisiertes Coenzym F_{420} wurde unter anaeroben Bedingungen in 120 mM Kaliumphosphat-Puffer, pH 6 gelöst. Das Coenzym wurde mit der zuvor für Methylen-H_4MPT beschriebenen Methode und Säule gereinigt. F_{420} wurde anhand seiner charakteristischen Absorption bei 420 nm Wellenlänge identifiziert.

4. Kristallographische Methoden

4.1 Proteinkristallisation

Alkohol-Deyhdrogenase. Zunächst wurde gereinigte F_{420}-abhängige Alkohol-Dehydrogenase unter den zuvor ermittelten Bedingungen (2,7 M NaCl in 100 mM Na-Citrat, pH 4,0) kristallisiert (Berk 1999). Dafür wurde das Enzym in 10 mM MOPS, pH 7 gelöst und eine Proteinkonzentration von 12 mg/ml eingestellt. Kristallisationsexperimente wurden als Dampfdiffusionsexperimente (Davies & Segal 1971) nach der \`hanging drop´-Methode angesetzt. Je 1 ml der Reservoirlösung wurde in 24-Loch-Zellkulturplatten (Hampton Research, CA, USA) gegeben. Die Proteinlösung wurde mit der Reservoirlösung auf zuvor silanisierten (2% Dichlor-Dimehtylsilanlösung) Deckgläschen gemischt (je 1 oder 2 µl) und auf die Kammer mit Reservoirlösung aufgesetzt, wobei zur Abdichtung Basilon-Siliconpaste (Bayer AG, Leverkusen) verwendet wurde. Die Kristallplatten wurden bei 4 °C gelagert. Aufgrund der ungenügenden Reproduzierbarkeit der entstandenen Kristalle wurden die Bedingungen modifiziert. Stabilisierte Alkohol Dehydrogenase (siehe unter Punkt 3.1, Seite 20) wurde kurz vor der Kristallisation mit 10 mM MOPS pH 7, 15 mM Mercaptoethanol gewaschen. Kristalle wurden unter neuen Kristallisationsbedingungen (3,6 M NaCl, 1% Polyethylenglycol (PEG) 8000 in 100

mM Na-Citrat, pH 4) regelmäßig reproduziert und für die Aufnahme von nativen Datensätzen oder die Präperation von Schweratomderivaten (siehe unter Punkt 4.2, Seite 26) verwendet.

Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase aus *M. marburgensis.* Gereinigte Reduktase Mer aus *M. marburgensis* wurde in 10 mM MOPS pH7, 15 mM Mercaptoethanol unter anaeroben Bedingungen gelöst. Für die Kokristallisation wurde Coenzym F_{420} (n = 1,8 µmol) in 10 mM MOPS (pH 7), 1 mM $Na_2S_2O_4$ mit 0,2 mg F_{420}-abhängiger Hydrogenase aus *M. marburgensis* unter H_2-Atmosphäre (1 bar Überdruck) bei 60 °C reduziert. Hydrogenase wurde von $F_{420}H_2$ mittels einer Centrikon (10 kDa Ausschlußgröße) getrennt und das reduzierte $F_{420}H_2$ lyophilisiert. Reduktase Mer (12 mg/ml) wurde mit $F_{420}H_2$ (1 mM Endkonzentration) und Methylentetrahydromethanopterin (1 mM Endkonzentration) vermischt. Die Kristallisationsansätze wurden unter anaeroben Bedingungen bei einer Temperatur von 8 °C in einem Anaerobenzelt vorbereitet und nach der \`sitting drop´-Methode mit Mikro-Brücken (Hampton Research, CA/USA) angesetzt. Für die Suche nach Kristallisationsbedingungen wurden die Crystal-Screen-Kits 1 und 2 (Jancarik & Kim 1991) verwendet. Kristalle, die nicht reproduzierbar waren, hatten eine orthorhombische Morphologie und entstanden bei einer Reservoirlösung mit 30% Polyethylenglycol 8000 in 0,1 M Na-Citrat, pH 5,6.

Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase aus *M. barkeri.* Das Enzym aus M. *barkeri* wurde vor der Kristallisation mit Coenzym F_{420} und Methylen-H_4MPT gemischt. Die Proteinkonzentration betrug 9 mg/ml, die der beiden Coenzyme je 1,5 mM. Die Kristallisationsexperimente wurden nach der \`hanging drop´-Methode unter anearoben Bedingungen bei 8 °C angesetzt und die Crystal-Screen-Kits 1 und 2 (Jancarik & Kim 1991) verwendet. Kristalle entstanden bei einem Ansatz mit einer Reservoirlösung welche 20% Polyethylenglycol 4000 und 10% 2-Propanol in 0,1 M Tris/HCl pH 8,5 enthielt.

4.2 Präparation von Schweratomderivaten

Schweratomderivate von Kristallen der Alkohol-Dehydrogenase. Für die Herstellung von Schweratomderivaten wurden die Proteinkristalle mit Hilfe einer auf einer Stahlnadel mit Magnethalter montierten Faserschlinge (Cryoloop, Hampton

Research, CA/USA) in eine Mikroschale mit Reservoirlösung transferiert. Dieser Lösung wurden die Schweratomverbindungen in Konzentrationen von 0,1 mM bis 3 mM zugesetzt und die Kristalle darin für 1 bis 24 Stunden inkubiert. Da manche Verbindungen schwer löslich waren, konnte die tatsächliche Konzentration nicht immer genau angegeben wurden. Da die Schweratomverbindungen häufig in höheren Konzentrationen oder bei längerer Einwirkung zur Zerstörung der Kristalle führen, müssen in einem iterativen Prozess Bedingungen gefunden werden, die zu einem Derivat führen, das einerseits noch gute Beugungseigenschaften aufweist und zum nativen Kristall isomorph ist, andererseits aber gut besetzte Schweratompositionen besitzt. Die in diesem Zusammenhang verwendeten Schweratomverbindungen sind in Tabelle 2 (Seite 14) aufgelistet.

4.3 Datenaufnahme und Datenprozessierung

Datenaufnahme mit Proteinkristallen der Alkohol-Dehydrogenase. Diffraktionsexperimente konnten nicht mit Stickstoff-tiefgekühlten Alkohol-Dehydrogenase-Kristallen durchgeführt werden, da die Kristalle für diese Methode in einen geeigneten cryoprotektiven Puffer transferiert werden müssen. Als Cryoprotektiva wurden 2-Methyl-2,4-Pentandiol, Glycerol, PEG 4000 und Ethylenglycol in unterschiedlichen Konzentrationen getestet, doch wurde die Kristallordnung durch die zugesetzten Agentien gestört. Dies war an einer hohen Mosaizität der Streumuster zu erkennen. Native und Derivat-Proteinkristalle wurden darauf hin in Glaskappillaren (Hampton Research, CA/USA) mit Wachs versiegelt und mit Knet-Material auf einem Goniometerkopf fixiert. Die Kristalle wurden auf ein Einkreis-Diffraktometer (Huber Diffraktionstechnik, München) montiert und mit einer senkrecht zur Achse des Röntgenstrahls positionierten CCD-Kamera justiert. Eine Luftstromanlage gewährleistete eine Temperatur von 8 bis 10 °C während der Datenaufnahme. Ein großer Teil der Datensätze wurde am MPI für Biophysik (Frankfurt/Main) mit Hilfe eines MSC Rigaku Ru-200 Röntgengenerators, welcher mittels einer rotierenden Anode CuK_α-Strahlung erzeugt, und eines Mar345 Imageplate-Detektors aufgenommen. Native Datensätze bis zu einer Auflösung von 1,7 Å wurden an der Synchroton-Beamline BW6 der Max-Planck-Gruppe für Strukturelle Molekularbiologie (DESY, Hamburg) gemessen. Nach einer ersten Aufnahme wurde auf der Basis von Mosaizität und Beugungsgrenze der Kristall-

Detektor-Abstand und der Oszillationswinkel gewählt. Da der Strahlungsschaden während der Aufnahmen am Kristall stark zunahm, wurde prozessiert und aufgrund der Indizierung ein optimaler Startwinkel mit dem Programm STRATEGY berechnet, um Daten in einem möglichst kleinen Oszillationsbereich sammeln und später zu einem nativen vollständigen Datensatz mit SCALEPACK skalieren zu können (HKL, Otwinowski & Minor 1997).

Prozessierung der Datensätze. Für die Datenprozessierung wurden die Programme XDISP, DENZO, SCALEPACK und STRATEGY (HKL, Otwinowski & Minor 1997) verwendet. Es wurden 4 native und unvollständige Datensätze zu einem Datensatz mit 96,2% Vollständigkeit zusammenskaliert. Dies war möglich, da Datensätze individueller Kristalle einen hohen Grad an Isomorphie aufwiesen.

Datenaufnahme mit Proteinkristallen der Reduktase Mer aus *M. marburgensis.* Ein Kristall wurde ohne cryoprotektive Zusätze im Stickstoffstrahl des Kryostaten (Oxford Cryosystems, Oxford, UK) eingefroren. Der Kristall wurde für die weitere Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Für den Transport diente ein Transport-Dewer (Taylor-Wharton). Ein Datensatz wurden an der Synchroton Beamline ID29 am ESRF (Grenoble, Frankreich) mit Hilfe eines ADSC Quantum 4 CCD Detektors aufgenommen.

Prozessierung des Datensatzes. Für die Datenprozessierung wurden die Programme XDISP, DENZO, SCALEPACK und STRATEGY (HKL, (Otwinowski & Minor 1997)) verwendet. Die Raumgruppe konnte nicht bestimmt werden.

Datenaufnahme mit Proteinkristallen der Reduktase Mer aus *M. barkeri*. Zum Einfrieren wurden die Kristalle in einen geeigneten cryoprotektiven Puffer (20% PEG 4000, 10% 2-Propanol, 20% Glycerol in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,5) transferiert, sehr schnell mit einem Cryoloop gefischt und in einem tiefkalten Stickstoffstrahl eingefroren. Die ersten Aufnahmen für die Beurteilung der Kristalle erfolgten am MPI für Biophysik unter Verwendung eines Röntgengenerators und eines MSC R-Axis 4++ Image-Plate-Detektors. Datensätze mit ausreichender Vollständigkeit wurden an der Synchroton Beamline ID29 am ESRF (Grenoble, Frankreich) mit Hilfe eines ADSC Quantum 4 CCD Detektors aufgenommen.

Prozessierung des Datensatzes. Die Prozessierung eines einzigen Datensatzes war möglich. Die Datenauswertung erfolgte mit Hilfe von XDS (Kabsch & Sander 1983).

4.4 Strukturbestimmung durch Isomorphen Ersatz

F_{420}-abhängige Alkohol-Dehydrogenase. Für die Lokalisierung von Schweratompositionen wurden die jeweiligen Derivatdatensätze mit einem nativen Datensatz in XPREP (Bruker Nonius) vereinigt. Für kristallographische Berechnungen wurde die CCP4-Software verwendet (Collaborative Computational Project 1994). Die automatische Lösung von isomorphen Differenz-Patterson-Karten auf der Basis eines Quecksilber (Hg1)- und eines Platin-Derivatdatensatzes (Pt1), wurde unter Verwendung der Software SHELXD (Sheldrick 1995; Sheldrick 1998) durchgeführt. Die Verfeinerung der Schweratompositionen, die Determination der Phase und die Suche nach weiteren Schweratompositionen durch die Differenz-Fourier-Technik wurden in SHARP (De La Fortelle & Bricogne 1997) berechnet. Statistiken der Auswertung werden im Ergebnisteil dieser Arbeit gezeigt und sind daher hier nicht angegeben. Nach Dichte-Modifikationen mit SOLOMON (Abrahams & Leslie 1996) war die resultierende Elektronendichtekarte von ausreichender Qualität, um in dem Programm O (Jones *et al*. 1991) interpretiert zu werden. Das manuelle Einfügen von Modellteilen wurde durch die Erstellung eines Hauptketten-Gerüsts in MAPMAN (Kleywegt & Jones 1996) und durch die automatisierte Interpretation der Modellbereiche Ser70 – Gly150 und Pro252 – Thr285 von MAID (Levitt 2001) erleichtert.

4.5 Strukturbestimmung durch Molekularen Ersatz

F_{420}-abhängige Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase. Die Phasen für die Fouriertransformation der Daten wurden durch Molekularen Ersatz und mit Hilfe der Programme AMORE (Navaza 1994) und EPMR (Kissinger *et al*. 1999) gelöst. Ein Dimer der Reduktase Mer aus *M. marburgensis* diente hierfür als Suchmodell. Für die weitere Verfeinerung des Modells wurde die Primärstruktur von Reduktase Mer aus *M. barkeri* über das Modell aus *M. marburgensis* modelliert (Schwede *et al*. 2003).

4.6 Modellbau und Modellverfeinerung

Der graphische Modellbau erfolgte mit dem Programm O (Jones *et al*. 1991). Die Modelle wurden einer individuellen Verfeinerung der Atomkoordinaten und der atomaren Temperaturfaktoren nach einem Standardprotokoll in CNS (Brunger *et al*. 1998) unterzogen. Manuelle Korrekturen am Modell wurden nach Interpretation der ($2F_o$-F_c) und (F_o-F_c) Elektronendichtekarten in O vorgenommen.

4.7 Erstellen von Abbildungen

Für die schematische Darstellung von Strukturmodellen wurden die Pro-gramme Molauto, Molscript (Kraulis 1991), Raster3D (Merritt & Murphy 1994) und PyMOL (DeLano Scientific LLC, USA) verwendet. Abbildungen von Elektronendichtekarten wurden mit Bobscript (Esnouf 1997) erstellt. Die Darstellung, welche Hauptketten der Reduktase Mer und der Luciferase LuxA übereinandergelegt zeigt, wurde unter zu Hilfenahme des DALI-Servers (Holm & Sander 1993) und Molscript erzeugt.

V Ergebnisse/Publikationen

Dieses Kapitel besteht aus zwei Publikationen, welche den Ergebnis-Teil der vorliegenden Arbeit beinhalten. Zum einen wird die Kristallstruktur der F_{420}-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase (Adf) mit gebundenen F_{420}-Addukt, zum anderen die ermittelte F_{420}-Bindestelle in Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (Mer) beschrieben. Auf Katalysemechanismen beider Enzyme, ein FMN-Modelling in bakterieller Luciferase und auf Vergleiche der F_{420}-Bindestellen in Adf, Mer, $F_{420}H_2$:NADP-Oxidoreduktase (Fno) und 8-HDF-Photolyase (Phr) wird im Diskussionteil näher eingegangen.

Eine differenzierte Einführung in den thematischen Zusammenhang der hier beschriebenen Kristallstrukturen wurde in der Einleitung gegeben. Der Leser wird zum Verständnis der Versuche auf den Material- und Methoden-Teil der Arbeit verwiesen, welcher in den nachfolgenden Veröffentlichungen nur kurz beschrieben ist, da einzelne experimentelle Details die Kristallisation bzw. die Strukturlösung ermöglicht haben. Eine erste Kristallisation und Charakterisierung von Adf-Kristallen wurde in der Arbeit von Dr. Holger Berk beschrieben (Berk 1999). Die Qualität und eine ungenügende Reproduzierbarkeit der Kristalle machten ein Fortführen der Kristallstrukturanalysen zu diesem Zeitpunkt unmöglich.

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit wurde eine kontinuierlichen Abnahme der Adf-Aktivität während des Wachstums von *Methanoculleus thermophilicus* mit 2-Propanol als einziger Energiequelle in einer N_2/CO_2-Gasatmosphäre beobachtet. Enzym, das eine zehnmal höhere spezifische Aktivität aufwies, wurde aus Zellen gereinigt, welche zuvor auf 2-Propanol und H_2/CO_2 gewachsen waren. Die in ihrer Enzymaktivität inhibierte Adf-Fraktion konnte mit Hilfe eines modifizierten Puffers kristallisiert werden, hochaktives Enzym hingegen nicht. Die Aufnahme von Datensätzen unter tiefkalten Cryo-Bedingungen erwies sich als schwierig und erforderte die Aufnahme der Kristalle in Glaskapillaren. Aufgrund der hohen Isomorphie war es möglich, unvollständige Datenätze durch Aufnahmen mit weiteren Kristallen zu ergänzen und zu einem vollständigen Datensatz zusammenzusetzen. Nach der Ermittlung des Röntgenstrukturmodells kann die schwache Aktivität des Enzyms anhand der Bindung eines F_{420}-Aceton-Adduktes in Adf erklärt werden. Die

Bildung des Addukts im aktiven Zentrum führt zu einer irreversiblen Bindung des Coenzyms F_{420} in der Alkohol-Dehydrogenase und blockiert die weitere Katalyse.

Kokristallisationsexperimente mit Mer aus *Methanothermobacter marburgensis* wurden zu Anfang durchgeführt und sind daher im Material und Methoden-Teil beschrieben. Da diese Kristalle eine hohe Mosaizität besaßen, die Raumgruppe nicht genau bestimmt werden konnte und die Daten mit der Methode des Molekularen Ersatzes zu keinem Ergebnis führten, werden diese Ansätze nicht weiter erwähnt.

In einem weiteren Anlauf wurde die Reduktase Mer aus *Methanosarcina barkeri*, einem mesophilen, methanogenen Archaeon für Kristallisationszwecke gereinigt. Eine Erklärung, warum aktives Enzym aus *M. marburgensis* nicht mit seinem Substrat kokristallisieren kann, könnte in der Anpassung an hohe Temperaturen liegen. Da thermophile Enzyme ein Temperaturoptimum zwischen 45 und 80° C haben, weisen ihre Tertiärstrukturen oft einen hohen Anteil intramolekularer Wechselwirkungen auf (Zecchinon *et al*. 2001). Die innere Festigkeit des thermophilen Enzyms bei niedrigen Temperaturen, die für die Kristallisation von Enzymen häufig angebracht ist, lässt es früh erstarren. Dies aber erschwert nötige Konformationsänderungen für die Bindung von Subtraten. Generell bilden mesophile Enzyme im Vergleich mit ihren thermophilen Verwandten weniger stabilisierende Wechselwirkungen aus (Kumar *et al*. 2000). Dies kann im Einzelfall bedeuten, dass an der Bindung beteiligte Domänen auch bei niedrigeren Temperaturen flexibel genug sind, um eine Substratbindung und somit eine Kokristallisation möglich zu machen. Da kooperative Bindungen zu einer Kokristallisation von Fno mit NADP und F_{420} geführt haben, wurden Kristallisations-Versuche mit beiden Substraten kombiniert durchgeführt. Um den oxidativen Zerfall von Methylen-H_4MPT zu verhindern, wurden die Kristallisationen in einem Anaerobenzelt angesetzt. Im Laufe der Arbeit wurden zwei Datensätze von zuvor gewachsenen Kristallen aufgenommen. Die nachfolgende Röntgenkristallstruktur basiert auf einem einzigen Datensatz und enthält F_{420} sowie ein gebundenes Polyethylenglycol-Molekül. Die Bindestelle des zweiten Substrates, Methylentetrahydromethanopterin, konnte in das aktive Zentrum von Mer modelliert werden.

Structure, Vol. 12, 361–370, March, 2004, ©2004 Elsevier Science Ltd. All rights reserved. DOI 10.1016/j.str.2004.02.010

Coenzyme Binding in F_{420}-Dependent Secondary Alcohol Dehydrogenase, a Member of the Bacterial Luciferase Family

Stephan W. Aufhammer,[1] Eberhard Warkentin,[2] Holger Berk,[1] Seigo Shima,[1] Rudolf K. Thauer,[1] and Ulrich Ermler[2,*]
[1]Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie
Karl-von-Frisch-Straße
D-35043 Marburg
[2]Max-Planck-Institut für Biophysik
Marie-Curie-Straße 15
D-60439 Frankfurt am Main
Germany

Summary

F_{420}-dependent secondary alcohol dehydrogenase (Adf) from methanogenic archaea is a member of the growing bacterial luciferase family which are all TIM barrel enzymes, most of which with an unusual nonprolyl *cis* peptide bond. We report here on the crystal structure of Adf from *Methanoculleus thermophilicus* at 1.8 Å resolution in complex with a F_{420}-acetone adduct. The knowledge of the F_{420} binding mode in Adf provides the molecular basis for modeling F_{420} and FMN into the other enzymes of the family. A nonprolyl *cis* peptide bond was identified as an essential part of a bulge that serves as backstop at the *Re*-face of F_{420} to keep it in a bent conformation. The acetone moiety of the F_{420}-acetone adduct is positioned at the *Si*-face of F_{420} deeply buried inside the protein. Isopropanol can be reliably modeled and a hydrogen transfer mechanism postulated. His39 and Glu108 can be identified as key players for binding of the acetone or isopropanol oxygens and for catalysis.

Introduction

Methanogenesis is the final process of the anaerobic degradation of biomass performed by methanoarchaea (Thauer, 1998). One third of the methane is generally formed from CO_2 by reduction with H_2. In a few organisms, alcohols, either ethanol or isopropanol, can also serve as electron donors for CO_2 reduction. In methanogens, ethanol oxidation is catalyzed by a NADP-dependent alcohol dehydrogenase (Berk and Thauer, 1997), which belongs to the medium-chain alcohol dehydrogenases. Isopropanol oxidation is carried out by a coenzyme F_{420}-dependent secondary alcohol dehydrogenase (Adf) (Widdel and Wolfe, 1989), which does not belong to any of the known alcohol dehydrogenase families. F_{420} is a 5′-deazaflavin with a redox potential of −360 mV (Figure 1). Notably, in several eukaryotes, isopropanol oxidation to acetone is catalyzed by short-chain alcohol dehydrogenases using the $NADP^+$/NADPH system for hydride transfer (Jornvall et al., 1995).

Adf has been isolated from *Methanoculleus thermophilicus* and *Methanofollis liminatans* and has been kinetically characterized (Bleicher and Winter, 1991; Widdel and Wolfe, 1989). The enzyme catalyzes hydride transfer from or to the *Si*-face of F_{420} (Klein et al., 1996), as found for all characterized F_{420}-dependent enzymes (Thauer, 1998). The homodimeric enzyme is built up of subunits with a calculated molecular mass of 37.2 kDa. The Adf encoding genes from both organisms have been cloned, sequenced, and expressed in *Escherichia coli* (Berk, 1999). The heterologously produced enzyme was only partially soluble; most of it was isolated as inclusion bodies. The soluble fraction, however, contained Adf with high activity.

Amino acid comparisons revealed Adf to be related to F_{420}-dependent oxidoreductase from *Streptomyces* (33% sequence identity) (Peschke et al., 1995), F_{420}-dependent hydride transferase 1 from *Rhodococcus* (27%) (Heiss et al., 2002), F_{420}-dependent methylenetetrahydromethanopterin reductase (Mer) from methanogenic archaea (26%) (Nolling et al., 1995; Vaupel and Thauer, 1995), bacterial luciferase (LuxAB) (25%) (Baldwin et al., 1979), glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacteria* (22%) (Purwantini and Daniels, 1998), and alkanesulfonate monoxygenase (SsuD) (22%) (van Der Ploeg et al., 1999) (Figure 2). From this enzyme family, referred to as the bacterial luciferase family, the F_{420}-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacteria* has recently alerted more general interest (Choi et al., 2001; Stover et al., 2000), since the enzyme is involved in oxygen stress defense in the pathogenic bacteria.

LuxAB (Fisher et al., 1996), Mer (Shima et al., 2000), and SsuD (Eichhorn et al., 2002) of the bacterial luciferase family are structurally characterized and consist primarily of an $(\alpha\beta)_8$ barrel. While LuxAB and Mer contain an unusual nonprolyl *cis* peptide bond in strand β3, this characteristic feature is missing in SsuD. Unfortunately, none of the three enzymes were, until now, structurally determined in complex with its coenzyme, FMN (LuxAB and SsuD) or F_{420} (Mer). The coenzymes could, however, be approximately modeled into the structures either, as in the case of LuxAB, by computer assisted conformational search methods (Lin et al., 2001) or qualitatively on the basis of the flavin position found in other unrelated flavin-containing TIM barrel enzymes, such as FAD-containing MetF (Guenther et al., 1999) and FMN-containing enzymes: old yellow enzyme (Fox and Karplus, 1994), trimethylamine dehydrogenase (Lim et al., 1986), glycolate oxidase (Lindqvist, 1989), and dihydroorotate dehydrogenase A (Rowland et al., 1997). Another flavin-dependent TIM barrel enzyme with known crystal structure is the nonfluorescent protein (Moore and James, 1994). Despite its bacterial luciferase-like fold, the nonfluorescent protein deviates considerably from those of the bacterial luciferase family, in that the two FMN molecules have completely different binding sites.

The coenzyme F_{420} is only transiently associated with Adf in the catalytic reaction (K_m = 18 μM in the case of Adf from *M. liminatans*), like the other members of bacterial luciferase family. However, in the case where

*Correspondence: ulrich.ermler@mpibp-frankfurt.mpg.de

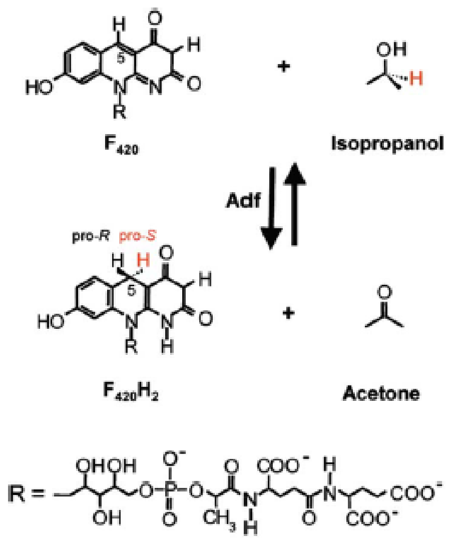


Figure 1. F_{420}-Dependent Alcohol Dehydrogenase Catalyzes the Oxidation of Isopropanol to Acetone with the Concomitant Reduction of F_{420} to $F_{420}H_2$

The enzyme is *Si*-face-specific with respect to the C5 atom of F_{420}. Coenzyme F_{420} is composed of a deazaflavin ring, a ribitol, a phosphate, a lactate, and two or more glutamates. The rest R in F_{420} is shown for F_{420}-2, the coenzyme present in *Methanoculleus*.

Adf was purified from the *M. thermophilicus* cells cultivated in the presence of 0.2% isopropanol in a 80% H_2/20% CO_2 atmosphere (see Experimental Procedures), the enzyme has been observed to copurify with F_{420}, indicating that F_{420} binds rather tightly to this enzyme. We therefore chose this enzyme preparation to characterize the cofactor binding mode in the bacterial luciferase family.

Results

Structure of Adf

The crystal structure of Adf has been resolved at 1.8 Å resolution in complex with a F_{420}-acetone adduct using the multiple isomorphous replacement method for phase determination (Table 1). The enzyme is present as a homodimer with a size of 75 Å × 50 Å × 50 Å (Figure 3A). Each monomer is basically built up of an $(\alpha\beta)_8$ barrel or TIM barrel fold according to triosephosphate isomerase (Banner et al., 1975), the first structurally elucidated protein of this architecture. The central strands of the $(\alpha\beta)_8$ barrel in Adf are arranged to form a funnel-shaped barrel broadened toward its C-terminal end, thereby creating a large roughly oval bottom (Figure 3). A similar TIM barrel core is found in LuxAB (Fisher et al., 1996), Mer (Shima et al., 2000), and SsuD (Eichhorn et al., 2002).

An unusual feature of the central β sheet is a bulge inserted into strand β3 exactly at the same position as described for LuxAB and Mer. This bulge that points into the interior of the TIM barrel is formed, in particular, by a nonprolyl *cis* peptide bond between Cys72 and Ile73. After the bulge, the direction of strand β3 changes by nearly 45° (Figure 4). The driving force for forming the energetically unfavorable nonprolyl *cis* peptide bond is difficult to grasp, although sequence and structural analysis clearly attribute a key function to the highly conserved Asp38. The carboxylate side chain of Asp38 is directed toward the bulge and would partly interfere with strand β3 if it would proceed straightforward. Moreover, the position of this carboxylate group is fixed by a salt bridge to Arg79 and by hydrogen bonds to the side chains of Tyr80 and Thr74, the latter stabilizing the conformation of the bulge (Figure 4).

The connecting segments between β strands and α helices of the TIM barrel core are mostly small, but four of them, named as insertion segments (IS) 1 to 4, are longer and are most likely of functional importance (Figure 3C). IS1 (Phe40–Gly52), following strand β2, consists of an extended loop without any secondary structure, and IS2 (Gly107–Pro120), following strand β4, is characterized by a small α helix. IS3 (Pro234–Asp286), following strand β6, is mainly composed of four short α helices and one β strand, which constitutes together with the prolonged strands β7 and β8 an additional three-stranded parallel β sheet nearly perpendicular to the central sheet. These three insertion regions are in tight contact to each other and cover the bottom of the C-terminal end of the TIM barrel (Figure 3C). IS4 (Gly141–Asp166), following helix α3 at the N-terminal side of the barrel, is attached parallel to helix α4.

The monomers of the dimer are related by a crystallographic 2-fold symmetry axis that is located parallel to the central strands (Figure 3A). Larger interface regions are formed between helix α2 and helix α2 of the symmetry-related partner, between helix α3 and helix α1, IS1, plus the loop following strand β3, and between IS4 and IS1 plus IS3. Altogether, the contact covers an area of 2215 $Å^2$, corresponding to about 16.4% of the surface area of the monomer (NACCESS; Hubbard et al., 1991). Notably, the same dimer arrangement was found in LuxAB, Mer, and SsuD. The dimer formation has, of course, a general stabilizing function, but structure analysis suggests additionally a direct function by fixing the conformations of IS1, IS2, and IS3, which are involved in F_{420} and substrate binding.

F_{420} Binding

F_{420} binds into a 15 Å long cavity that extends from the C-terminal end of the TIM barrel to the protein surface (Figure 3). The substituent of F_{420} consisting of a ribitol, a lactate, a phosphate, and two glutamates (Figure 1) is arranged perpendicular to the direction of the central strands in an elongated manner. The isoalloxazine ring is bound to Adf in a bent conformation with an angle of 26° between the peripheral rings (Figure 4). The coenzyme binding site is completely occupied by F_{420}, as indicated by roughly identical temperature factors (~21 $Å^2$) of the deazaflavin ring and its environment.

The deazaisoalloxazine head of F_{420} is positioned partly inside the barrel and is embedded into a pocket located at one side of the broadened bottom at the C-terminal

F_{420}-Dependent Alcohol Dehydrogenase
363

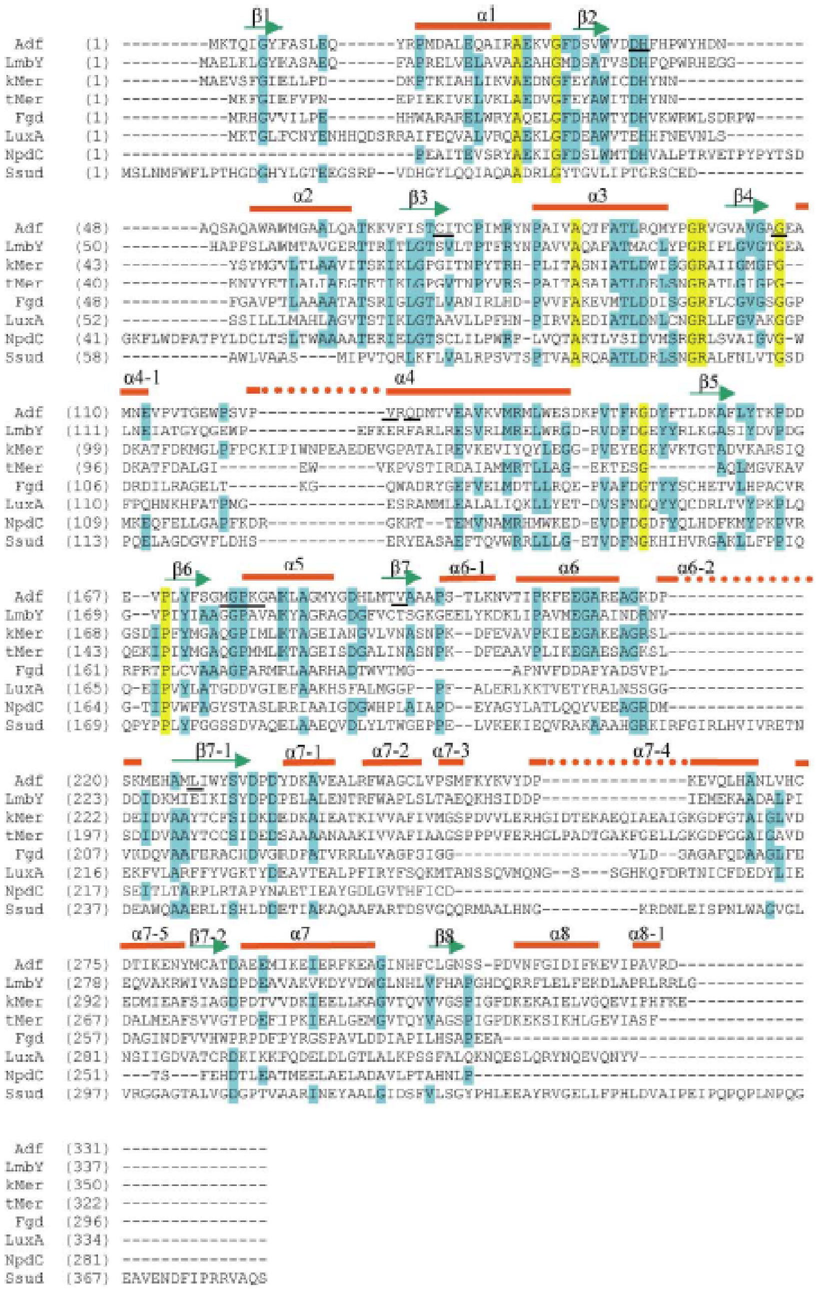


Figure 2. Sequence Alignment of the Bacterial Luciferase Family

A larger subfamily is characterized by a nonprolyl *cis* peptide bond; a smaller subfamily to which SsuD belongs does not contain such a bond. Identical residues are colored in yellow, and conserved residues are colored in blue. Arrows and bars above indicate the secondary structure assignment based on the Adf structure. Residues involved in F_{420} binding are underlined.

Table 1. Data Collection

Data Set	Native1	Native2	Pt1[a]	Pt2[a]	Hg1[a]	Pb1[a]
Resolution (Å)	2.6 (2.64–2.6)	1.8 (1.83–1.8)	3.0 (3.06–3.0)	3.0 (3.06–3.0)	3.0 (3.06–3.0)	3.0 (3.06–3.0)
Multiplicity	3.1(3.1)	3.9 (3.8)	2.3 (2.2)	2.3 (2.1)	2.6 (2.5)	3.2 (3.2)
Completeness (%)	96.2 (94.5)	99.2 (99.4)	94.2 (93.8)	82.0 (83.8)	94.0 (94.8)	90.9 (95.5)
I/σ_I	25.9 (5.9)	28.3 (3.2)	13.6 (5.3)	11.9 (3.5)	17.8 (7.0)	23.3 (10.3)
No. of crystals	3	7	1	1	1	1
R_{sym}, R_{merge} (%)[b]	7.9 (24.6)	6.7 (35.0)	12.1 (30.3)	12.4 (33.2)	9.8 (24.5)	9.6 (21.1)
R_{der} (%)[c] (5–10 Å)			10.6	12.4	7.5	4.5
Phasing power[d]			2.0	2.3	2.0	0.6

[a] Pt1: K_2PtCl_4, 0.9 mM (soaking concentration), 16 hours (soaking time); Pt2: di-μ-iodo-bis (ethylenediamine) di-platinum II nitrate (PIP), 0.3 mM, 24 hours; Hg1: MeHgOAc, 0.1 mM, 16 hours; Pb1: Me_3PbOAc, 0.9 mM, 16 hours.
[b] $R_{sym} = \Sigma_{hkl}\Sigma_i \, |I_i - \langle I \rangle| / \Sigma \langle I \rangle$; I_i, intensity of the i^{th} measurement per reflection hkl; $\langle I \rangle$, average intensity for a reflection hkl.
[c] $R_{der} = \Sigma_{hkl} \, ||F_P| - |F_{PH}|| / \Sigma_{hkl}|F_P|$, $|F_P|$ and $|F_{PH}|$ are the structure factor amplitudes for the native protein and the heavy-atom derivatives.
[d] Phasing power is defined as $\langle |F_H|/e \rangle$; $e = ||F_{PH}| - |F_P + F_H||$ is the residual lack of closure. F_H is the calculated heavy-atom structure factor amplitude, and F_{PH} and F_P are the structure factors with and without heavy atoms.

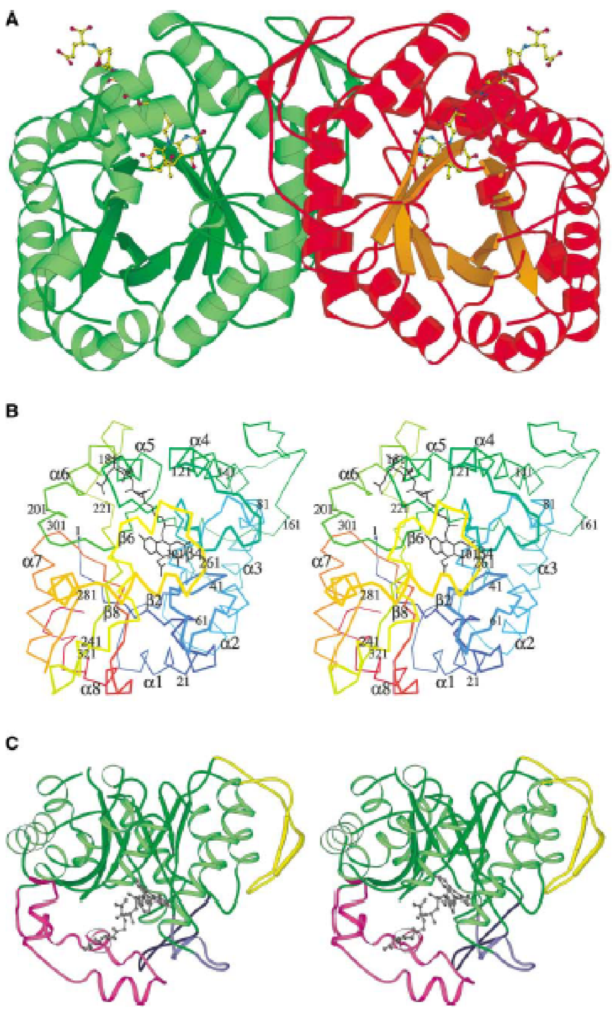


Figure 3. Structure of Adf from *Methanoculleus thermophilicus*

(A) Ribbon diagram of the dimer that shows the TIM barrel architecture of the monomer. The interface between the monomers is formed by three peripherical α helices and the insertion segments.

(B) Stereo representation of the C_α chain of the Adf monomer.

(C) Stereo plot of the Adf monomer (rotated 90° compared to [B]). The representation focuses on the conformation of the insertion regions (IS 1 to 4 in blue, sky-blue, magenta, and yellow) that are crucial for substrate binding and for the formation of the active site.

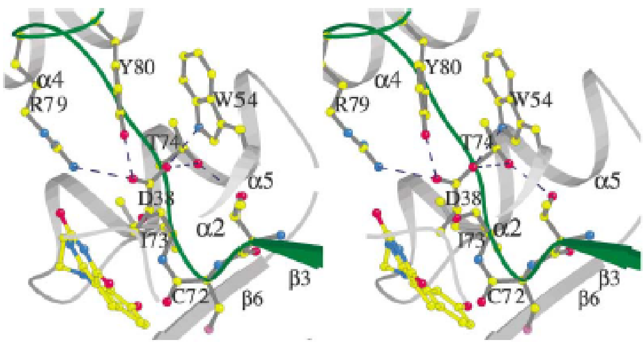


Figure 4. The Nonprolyl *cis* Peptide Bond in Adf

The nonprolyl *cis* peptide bond between Cys72 and Ile73 is an essential constituent of a bulge that is directed toward the F_{420} binding site, causing a bent conformation of the deazaisoalloxazine ring. The well-conserved Asp38, which would partly interfere with a straight course of strand β3, is strongly linked to the polypeptide chain and stabilizes the bulge. These favorable interactions might compensate for the energy lost when forming the nonprolyl *cis* peptide bond.

end. The three-membered ring system is flanked by strands β2 and β6, and its *Re*-face is attached to strands β3 and β5 (Figure 3). The so-called butterfly conformation is maintained at the *Si*-face by fixing the pyrimidine and hydroxybenzyl wings via His39 and Glu108 and by Val193 and Ile227, respectively. The central pyridine ring is kept in its position outside the plane by the nonprolyl *cis* peptide oxygen of Cys72 and by the side chain of Ile73 pointing toward its *Re* side and acting as a backstop (Figure 4). Incorporation of a *cis* proline at position 73 would substantially press the deazaflavin ring out of its binding site, indicating the functional necessity of a nonprolyl *cis* peptide bond. Interestingly, nonprolyl *cis* peptide bonds are rarely found in proteins and always have a specific function (Jabs et al., 1999). The isoalloxazine ring is anchored to the protein matrix by several interactions taking the amphipatic nature of the isoalloxazine ring into account (Figure 5A). Except for His39 and Ser173, hydrogen bonds are only formed to main chain atoms, providing a rigid coenzyme binding mode. A comparison between the Adf-derived and the calculated binding site (Lin et al., 2001) resulted in a very similar binding position. However, the orientation of the isoalloxazine ring substantially deviates, such that the bulge serves as a backstop in the Adf-based model and as a hydrogen bond mediator in the calculated model.

The substituent of F_{420} is buried inside the protein until the first glutamate and contributes significantly to coenzyme binding involving, in particular, IS1, IS2, and IS3 (Figure 5A). The second glutamate is solvent exposed and highly flexible. Notably, residue 176, which interacts with the phosphate group, has to be a glycine to avoid a clash with F_{420}. This residue is not conserved in the FMN-dependent luciferase and perhaps provides a general distinctive feature for F_{420} and FMN-dependent members of this family (Figure 2).

Acetone Binding

Additional electron density was rather unexpectedly found at the *Si*-face of F_{420} and was determined to be isopropanol or acetone (Figures 3 and 5B). Several models with and without acetone or isopropanol, either covalently bound or in an unbound state, were refined. The resulting electron density maps at 1.8 Å resolution clearly support the presence of an F_{420}-acetone adduct. The distance between the C1 atom of acetone and the C5 atom of F_{420} was refined to 1.5 Å, and the arrangement of the C1, C2, C3, and O atoms is clearly planar. The substrate binding pocket completely buried inside the enzyme is formed by the deazaflavin ring and side chains of strands β1, β2, β6, and β7 and of IS1, IS2, and IS3. These side chains comprising Phe8, His39, Trp43, Glu108, Val193, Trp229, Trp246, Cys249, and Phe255 are mainly bulky and hydrophobic, but a few are also polar and apparently play an important functional role (see below).

The binding of acetone is characterized by the interactions between its carbonyl oxygen and the polypeptide side chains (Figure 5B). The oxygen atom is in an ideal distance for hydrogen bond formation to the carboxylate group of Glu108, protruding from strand β4, to the imidazole ring of His39, and to the indol group of Trp43, the latter residues originating from the loop following β3. The carboxylate group of Glu108 and the imidazole group of His39 are kept in place via hydrogen bonds to the amide group of Asn111 and to the carbonyl group of His41, respectively. Trp43 is embedded in a hydrophobic pocket formed by Met210, Gly248, Cys249, Val251, Met254, Phe255, and Val265. Interestingly, the side chains of His39 and Glu108 are 3 Å apart, but a hydrogen bond can only be formed upon breaking the bond to the oxygen of acetone and rotating the imidazole ring (Figure 5B). Notably, the imidazole ring of His39 is also in van der Waals contact to the carboxylate group of Glu12, which is hydrogen bonded to Asp37. This latter residue, Asp37, is solvent accessible and thus capable of proton transfer to the outside of this protein (Figure 5B). It is conceivable that Glu12 is protonated, since it is in a rather hydrophobic environment.

Discussion

Flavin-Dependent TIM Barrel Structures

Adf is characterized by a TIM barrel fold, an unusual nonprolyl *cis* peptide bond, and its specificity for the deazaflavin F_{420}, which acts as a coenzyme instead of a prosthetic group. These properties are characteristic for most members of the bacterial luciferase family (Figure 2). Within this family, only SsuD (and some very related enzymes) does not contain the constituting nonprolyl *cis* peptide bond. The other structurally known flavin-dependent TIM barrel enzymes bind flavin as a

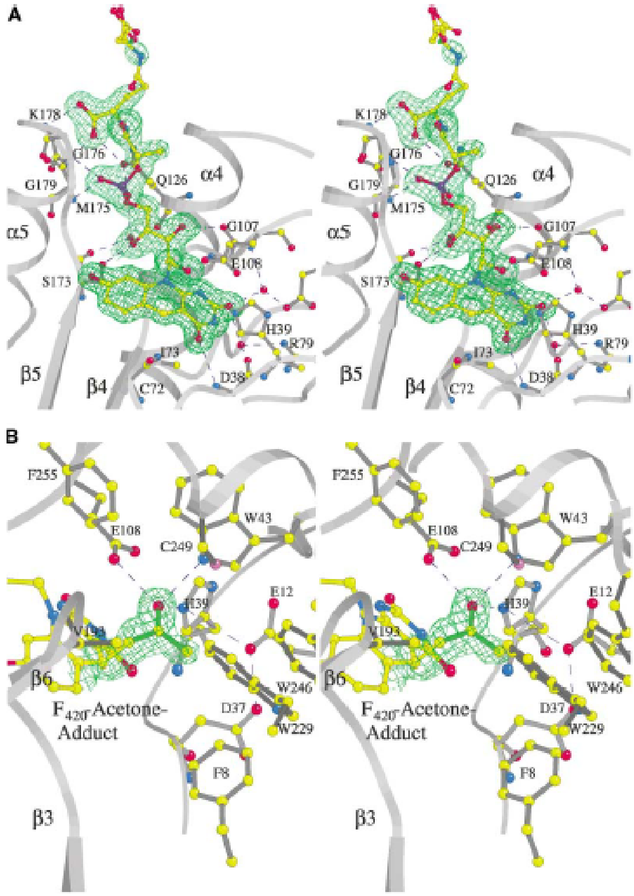


Figure 5. Stereo Plot Showing the Interactions between the Coenzyme Molecule—F_{420}—and the Enzyme and the Relative Positions of the F_{420} and Acetone Moieties of the F_{420}-Acetone Adduct

(A) F_{420} is bound into a 15 Å long cavity extending from the C-terminal end of the TIM barrel to the protein surface. It is linked to the protein matrix by 11 direct hydrogen bonds, mainly to main chain atoms. The negatively charged phosphate group is hydrogen bonded to the amide nitrogen of Gln126 and to the peptide nitrogens of Met175 and Gly176. The first glutamate of F_{420} is fixed by helix α5, as the partially positive charge of its N-terminal end interacts with the negative charge of the carboxylate group.

(B) The acetone as part of the F_{420}-acetone adduct binds into a predominantly hydrophobic pocket at the *Si*-face of F_{420}. Residues His39, Glu108, and Trp43 are crucial for binding of the carbonyl oxygen of acetone. The hydroxyl oxygen of isopropanol probably binds to the same position and serves as an anchor for modeling the substrate.

prosthetic group and have no sequence similarity to the bacterial luciferase family.

According to a primary structure alignment, the residues contacting F_{420} are not conserved (Figure 2) in the luciferase family, reflecting the low overall sequence identity, the use of main chain atoms to provide polar interactions, and the possibility of equivalently exchanging hydrophobic contact residues. The sole exception in the nonprolyl *cis* peptide family is the strictly conserved His39 whose imidazole side chain is involved in F_{420} binding and substrate binding as well as catalysis (see below). Surprisingly, conserved residues were found in linker segments between the helices and strands at the N-terminal side of the barrel, suggesting that they might be involved in fine-tuning the directions of the strands. For example, a hydrogen bond is formed between the strictly conserved residues Thr64 and Arg99 to adjust strands β3 and β4, which are both involved in F_{420} binding (Figure 2).

In contrast to residues involved in flavin binding, the amino acids surrounding the nonprolyl *cis* peptide bond are better conserved. This allows a clear discrimination between the SsuD subfamily and the nonprolyl *cis* peptide subfamily, and the definition of a general fingerprint (together with His39) for the larger group of the luciferase family. A major role is assigned to the highly conserved Asp38 (in luciferase a glutamate) that stabilizes the bulge on one hand and would partly interfere with a straight course of strand β3 on the other. Asp38 is strongly fixed in its position, in particular, by a salt bridge to a positively charged residue at position 79, either arginine or histidine (Figures 2 and 3). The optimal binding situation for Asp38 is speculated to be the driving force for forming the energetically unfavorable nonprolyl *cis* peptide bond that results in the formation of a bulge. The residues of the bulge are less well conserved, although they reveal several common features. Residue 71 is either a proline or a threonine, residue 72 is rather variable, residue 73 is either a isoleucine or a valine, and residue 74 is mostly a threonine or a branched aliphatic amino acid (Figure 2). Altogether, the following consensus sequence can be derived: D/E-H-x(20-30)-I/L-S/G-x-I/V/A-x5-R/H.

Formation of the F_{420}-Acetone Adduct

Adf was structurally characterized in complex with an F_{420}-acetone adduct. The surprising formation of a cova-

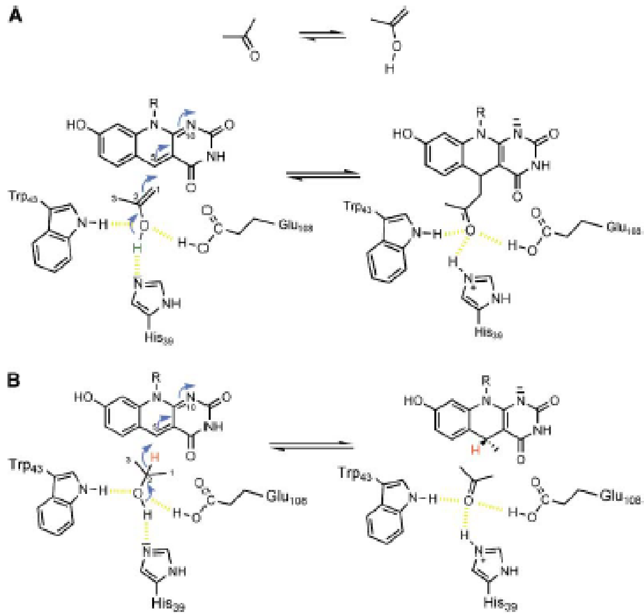


Figure 6. Proposed Mechanism of F_{420}-Acetone Formation and of Isopropanol Oxidation

(A) The reaction between acetone and oxidized F_{420} can be understood on the basis of the nucleophilic attack of the C1 atom of acetone onto the C5 atom of F_{420}. The C1 atom is electron rich, as seen in the enol or enolate tautomere of acetone.

(B) Hydride transfer from the C2 atom of acetone to the C5 atom of the *Si* side of the F_{420}. His39 is postulated to be the general catalytic base that abstracts a proton from isopropanol, whereas the protonated Glu108 and Trp43 stabilize the partly generated alcoholate anion in the transition state.

lent bond between the atoms C5 of F_{420} and C1 of acetone can be mechanistically explained considering the nucleophilic character of the C1 atom, especially in the enolate form of acetone. The enol form is only present in minor amounts ($K_{eq} = 1.5 \times 10^{-7}$) in water (Figure 6A), but in the protein the keto/enol tautomerization equilibrium might be substantially shifted (Benach et al., 1999). Due to the adjacent residues His39 and Glu108 that can serve as hydrogen donors and acceptors, structural analysis favors binding of a hydroxyl group as compared to an oxo atom. His39 would be optimally placed to serve as general acid to protonate the keto group of acetone, and simultaneously, Glu108 might accept a proton from the C1 atom placed 3.7 Å away from the carboxyl group (Figure 5B).

Accordingly, the electron-rich C1 atom nucleophilically attacks the electrophilic C5 atom of the oxidized F_{420} and generates the adduct. His39 can additionally function as a general base by accepting a proton from the hydroxyl group during the carbon-carbon linkage (Figure 6A). An analogous covalent NADP-acetone adduct was previously found for *Drosophila* short-chain alcohol dehydrogenase (Benach et al., 1999). The postulated mechanism for its biosynthesis exactly corresponds to that described for the formation of the F_{420}-acetone adduct. The formation of such an adduct tighly blocks the active site cavity of Adf and results in a dead-end enzyme.

As indicated above and outlined in Figure 6A, both acetone and oxidized F_{420} are required for the formation of the F_{420}-acetone adduct in the active site of Adf. This explains why adduct-containing Adf was primarily found in cells incubated under N_2/CO_2 after growth on H_2/CO_2 and isopropanol. Acetone accumulates during growth. Then, during incubation under N_2/CO_2, coenzyme F_{420} is oxidized via an F_{420}-dependent hydrogenase. This interpretation is substantiated by the finding that the specific activity of Adf decreased continuously during a 2 day incubation of cells under N_2/CO_2. Finally, the specific activity was estimated to be lower than 10% of Adf purified from cells before induction of adduct formation.

Substrate Binding and Hydride Transfer

The position of the acetone as part of the F_{420}-acetone adduct does not exactly correspond to that of isopropanol prior to the reaction. Nevertheless, reliable modeling of isopropanol into its binding site is straightforward, provided that the observed position of the acetone oxygen is also the binding site for the isopropanol oxygen forming the same interactions with the polypeptide matrix (Figure 5B). Moreover, isopropanol must be bound in a manner to orient the hydrogen of its C2 atom toward the C5 atom of the isoalloxazine (Figure 6B) like the C1 atom of acetone in the F_{420}-acetone adduct (Figure 6A). According to these restraints, the C3 atom of isopropanol is in a similar position as the C3 atom of the observed F_{420}-acetone adduct and in van der Waals contact to Phe8, Glu12, Asp37, His39, Trp229, Trp246, and the deazaflavin ring. The C1 atom is in van der Waals contact to Phe43, Trp229, and Cys249. In this orientation, the C3 atom is completely surrounded by protein atoms, while there is space for at least one additional methyl group in front of the C1 atom. This structural finding is in agreement with kinetic data that Adf can oxidize isopropanol, isobutanol, and isopentanol but cannot oxidize larger secondary alcohols (Bleicher and Winter, 1991). The specificity for these secondary alcohols comes from the bulky and hydrophobic side chains. Thus, site-directed amino acid exchanges can be used

to design binding sites with different specificities for new substrates.

The position of F_{420} and isopropanol defines the active site for hydride transfer in the interior of Adf that is completely shielded from bulk solvent. As observed in many enzymes, the polypeptide framework keeps the reaction partners in a favorable relative position. Accordingly, the distance of 2.9 Å between the C2 atom of isopropanol and the C5 atom of F_{420} is optimal for hydride transfer. Two structural features in Adf appear to be functionally crucial and warrant additional discussion. First, the reduced deazaflavin ring is present in a bent conformation (Figure 4) which is, according to molecular orbital calculations, energetically favorable for the reduced but not for the oxidized state (Hall et al., 1987). If the butterfly conformation of F_{420} is approximately maintained in the oxidized state, the three-membered ring is strained and the concomitant higher energy decreases the activation energy for reaching the transition state. Formation and stabilization of the butterfly conformation is attributed to the bulge that is constituted by a nonprolyl *cis* peptide bond in which the carbonyl oxygen serves as backstop (Figure 4). Second, the polypeptide environment around the isopropanol hydroxyl group allows abstraction of a proton and the subsequent stabilization of the partially negatively charged oxygen in the transition state (Figure 6B). From structural studies, the function of His39 or Glu108 as general bases cannot be definitely identified. Adjacent histidine and glutamate residues are normally considered to be charged at neutral pH, but His39 and especially Glu108 are buried in a hydrophobic region such that an uncharged state of one or both residues seems energetically attainable. We postulate a mechanism based on the uncharged state, but further structural and functional studies with enzymes containing site-specific amino acid exchanges are essential for clarifying the mechanism (see Figure 6B). Accordingly, if His39 acts as a general catalytic base for accepting the hydroxyl hydrogen of isopropanol, the partially formed alcoholate anion would then be neutralized by hydrogen bonds to Trp 43 and protonated Glu108. Moreover, the distance between the carboxylate oxygen of Glu108 and the N10 atom of the deazaflavin is 3.4 Å, so the protonation of the N10 atom by Glu108 is possible. Interestingly, the oxidation of a hydroxyl group can be enzymatically catalyzed rather differently. In zinc-dependent alcohol dehydrogenases, the transition energy is predominantly decreased by coordinating the alcohol anion to a Zn^{2+} (Eklund et al., 1982), and in secondary alcohol dehydrogenases (Benach et al., 1999) and in L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase (Barycki et al., 1999) by abstracting a proton using the strong bases tyrosylate and histidine, the latter being enhanced by a nearby glutamate.

Experimental Procedures

Preparation of the Enzyme

Methanoculleus thermophilicus (strain TCI; DSMZ 3915) deposited in the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen (Braunschweig, Germany) was grown at 55°C in the presence of 0.2% isopropanol in an 80% H_2/20% CO_2 atmosphere for 5 days up to an optical density of 0.2. Then the culture was supplemented with 0.5% isopropanol in an 80% N_2/20% CO_2 atmosphere, further incubated without growing at 55°C for 2 days, and then harvested (Berk, 1999; Widdel and Wolfe, 1989). F_{420}-dependent alcohol dehydrogenase (Adf) was isolated under anaerobic conditions using ammonium sulfate precipitation and a Phenyl-Sepharose HiLoad 26/10 column as described (Klein et al., 1996). For purification, buffers were supplemented with 15 mM mercaptoethanol. About 2.5 mg pure enzyme, with a specific activity of 7.7 U/mg at 40°C under standard assay conditions (Widdel and Wolfe, 1989), could be isolated from 1 liter of culture. When the cells were harvested after 5 days of growth, before 2 days incubation under N_2/CO_2, the purified Adf had a specific activity of 50 U/mg. However, the highly active enzyme preparations did not crystallize under the conditions employed. The same was true for heterologously produced Adf in *E. coli*, which also had a specific activity of 50 U/mg.

The purified enzyme with the specific activity of 7.7 U/mg was unstable in low ionic strength buffers. Stabilization could be achieved by supplementing solutions of Adf with 40 mM sodium phosphate (pH 7), 200 mM sodium sulfate, 10 mM 2-propanol, and 15 mM mercaptoethanol (Bleicher and Winter, 1991). Under these conditions, the enzyme could be stored for several days without considerable loss of activity.

Crystallization and Data Collection

Shortly before crystallization, the stabilized enzyme was transferred into a buffer containing 10 mM MOPS/KOH (pH 7) and 15 mM mercaptoethanol. The protein concentration was 15 mg/ml. The search for initial crystallization conditions was carried out with Hampton Research crystallization kits (Jancarik and Kim, 1991) at a temperature of 4°C using the hanging drop vapor diffusion method. Crystals could be obtained with NaCl as precipitant. They grew best in a drop consisting of 2 μl of enzyme solution (12 mg/ml) and 2 μl of reservoir solution consisting of 0.1 M citrate-NaOH (pH 4), 1% PEG 8000, and 3.6 M NaCl. The obtained space group of $C222_1$ and the unit cell parameters of a = 86.8 Å, b = 156.3 Å, and c = 60.2 Å are compatible with one monomer per asymmetric unit (Matthews, 1968). The solvent content is 51.6%. Since all applied cryoprotectants damaged the crystals substantially, data collection was performed at temperatures of 4°–8°C using crystals mounted in fine glass capillaries. The high radiation sensitivity of the crystals required data collection from several crystals to obtain a complete data set to higher resolution. For efficient data collection, STRATEGY (Ravelli et al., 1997) was applied. Data sets Native1, Pt1, Pt2, Hg1, and Pb1 were measured at a temperature of 8°C using a Rigaku rotating Cu anode and a MarResearch image plate detector. Native data to 1.7 Å resolution (Native2) were collected at Max-Planck beam line BW6 at the Deutsches Elektronen Synchroton in Hamburg. Processing and scaling of the reflections were performed with the HKL suite (Otwinowski and Minor, 1997). The statistics of the data sets are summarized in Table 1.

Phase Determination and Model Building

Phases of Adf crystals were determined by the method of multiple isomorphous replacement on the basis of four heavy atom derivatives (Table 1). Crystallographic calculations were achieved within the CCP4 program suite (CCP4, 1994). The difference Patterson map of the derivatives Pt1 and Hg1 could be interpreted using SHELXD (Schneider and Sheldrick, 2002). Heavy-atom coordinate refinement, phase determination, and the search for further heavy-atom binding sites by difference Fourier techniques were preformed in SHARP (De La Fortelle and Bricogne, 1997). Phase statistics are listed in Table 1, the overall figure of merit being 0.54 in the resolution range 100–2.6 Å. After solvent flattening (SOLOMON; Abrahams and Leslie, 1996) calculated in the space group $C222_1$, the quality of the electron density was sufficiently high to incorporate a polypeptide model with O (Jones et al., 1991) using the density skeletonization option (MAPMAN; Kleywegt and Jones, 1996). Model building was facilitated by automatically fitting the segments ranging from Ser70 to Gly150 and from Pro252 to Thr285 using MAID (Levitt, 2001).

Model Refinement and Quality of the Model

Refinement was performed using CNS (Brunger et al., 1998), applying standard protocols and manual correction using O (Jones et al., 1991). Water atoms were selected automatically in two rounds;

a few were picked manually. Two peaks were assigned to Cl^- on the basis of their coordination and interatomic distances, and one was assigned to K^+. The R values converged to R = 0.155 and R_{free} = 0.187 in the resolution range 20–1.8 Å (0.205 and 0.236, respectively, between 1.85 and 1.80 Å) with the model including 330 amino acids, 1 F_{420}-acetone adduct, and solvent molecules (146 H_2O, 2 Cl^-, $1K^+$). The average displacement factor is B = 26.5 $Å^2$, and the root-mean-square deviation from the standard values (Engh and Huber, 1991) of the bond lengths is 0.016 Å and of the angles is 1.7°. The quality of the model was checked within CNS and PROCHECK (Laskowski et al., 1993). The Ramachandran plot showed all of the nonglycine or nonproline residues except one in the most favored (91.7%) or additionally allowed regions (8.0%).

Figure Preparation

Figures 3, 4, and 6 were generated using MOLSCRIPT (Kraulis, 1991), and Figure 5 was generated using BOBSCRIPT (Esnouf, 1997).

Acknowledgments

This work was supported by the Max-Planck-Gesellschaft and the Graduiertenkolleg "Protein Function at the Atomic Level" of the DFG. We thank Hartmut Michel for continuous support, Erica Lyon for reading the manuscript, and the staff of Max-Planck beamline BW6 at DESY, Hamburg, in particular Gleb Bourenkov, for help during data collection.

Received: October 2, 2003
Revised: November 14, 2003
Accepted: November 29, 2003
Published: March 9, 2004

References

Abrahams, J.P., and Leslie, A.G.W. (1996). Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F-1 ATPase. Acta Crystallogr. D *52*, 30–42.

Baldwin, T.O., Ziegler, M.M., and Powers, D.A. (1979). Covalent structure of subunits of bacterial luciferase: NH_2-terminal sequence demonstrates subunit homology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA *76*, 4887–4889.

Banner, D.W., Bloomer, A.C., Petsko, G.A., Phillips, D.C., Pogson, C.I., Wilson, I.A., Corran, P.H., Furth, A.J., Milman, J.D., Offord, R.E., et al. (1975). Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data. Nature *255*, 609–614.

Barycki, J.J., O'Brien, L.K., Bratt, J.M., Zhang, R., Sanishvili, R., Strauss, A.W., and Banaszak, L.J. (1999). Biochemical characterization and crystal structure determination of human heart short chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase provide insights into catalytic mechanism. Biochemistry 38, 5786–5798.

Benach, J., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., and Ladenstein, R. (1999). The catalytic reaction and inhibition mechanism of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: observation of an enzyme-bound NAD-ketone adduct at 1.4 A resolution by X-ray crystallography. J. Mol. Biol. *289*, 335–355.

Berk, H. (1999). F_{420} und NADP-abhängige Alkohol-Dehydrogenasen und $F_{420}H_2$:NADP-Oxidoreduktasen aus methanogenen Archaea: Struktur und Stereospezifitat. Ph.D. thesis, Philipps-Universitat Marburg/Lahn, Marburg/Lahn, Germany.

Berk, H., and Thauer, R.K. (1997). Function of coenzyme F_{420}-dependent NADP reductase in methanogenic archaea containing an NADP-dependent alcohol dehydrogenase. Arch. Microbiol. *168*, 396–402.

Bleicher, K., and Winter, J. (1991). Purification and properties of F_{420}- and NADP(+)-dependent alcohol dehydrogenases of *Methanogenium liminatans* and *Methanobacterium palustre*, specific for secondary alcohols. Eur. J. Biochem. *200*, 43–51.

Brunger, A.T., Adams, P.D., Clore, G.M., DeLano, W.L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Jiang, J.S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N.S., et al. (1998). Crystallography & NMR system: a new software suite for macromolecular structure determination. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *54*, 905–921.

CCP4 (Collaborative Computational Project 4) (1994). The CCP4 suite: programs for protein crystallography. Acta Crystallogr. D *50*, 760–763.

Choi, K.P., Bair, T.B., Bae, Y.M., and Daniels, L. (2001). Use of transposon Tn5367 mutagenesis and a nitroimidazopyran-based selection system to demonstrate a requirement for fbiA and fbiB in coenzyme F(420) biosynthesis by *Mycobacterium bovis* BCG. J. Bacteriol. *183*, 7058–7066.

De La Fortelle, E., and Bricogne, G. (1997). Maximum likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. Methods Enzymol. *276*, 472–494.

Eichhorn, E., Davey, C.A., Sargent, D.F., Leisinger, T., and Richmond, T.J. (2002). Crystal structure of *Escherichia coli* alkanesulfonate monooxygenase SsuD. J. Mol. Biol. *324*, 457–468.

Eklund, H., Samama, J.P., and Wallen, L. (1982). Pyrazole binding in crystalline binary and ternary complexes with liver alcohol dehydrogenase. Biochemistry *21*, 4858–4866.

Engh, R.A., and Huber, R. (1991). Accurate bond and angle parameters for X-ray protein structure refinement. Acta Crystallogr. *A47*, 392–400.

Esnouf, R.M. (1997). An extensively modified version of MOLSCRIPT that includes greatly enhanced coloring capabilities. J. Mol. Graph. *15*, 133–138.

Fisher, A.J., Thompson, T.B., Thoden, J.B., Baldwin, T.O., and Rayment, I. (1996). The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions. J. Biol. Chem. *271*, 21956–21968.

Fox, K.M., and Karplus, P.A. (1994). Old yellow enzyme at 2 Å resolution: overall structure, ligand binding, and comparison with related flavoproteins. Structure *2*, 1089–1105.

Guenther, B.D., Sheppard, C.A., Tran, P., Rozen, R., Matthews, R.G., and Ludwig, M.L. (1999). The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. Nat. Struct. Biol. *6*, 359–365.

Hall, L.H., Bowers, M.L., and Durfor, C.N. (1987). Further consideration of flavin coenzyme biochemistry afforded by geometry-optimized molecular orbital calculations. Biochemistry *26*, 7401–7409.

Heiss, G., Hofmann, K.W., Trachtmann, N., Walters, D.M., Rouviere, P., and Knackmuss, H.J. (2002). npd gene functions of *Rhodococcus (opacus) erythropolis* HL PM-1 in the initial steps of 2,4,6-trinitrophenol degradation. Microbiol. *148*, 799–806.

Hubbard, S.J., Campbell, S.F., and Thornton, J.M. (1991). Molecular recognition. Conformational analysis of limited proteolytic sites and serine proteinase protein inhibitors. J. Mol. Biol. *220*, 507–530.

Jabs, A., Weiss, M.S., and Hilgenfeld, R. (1999). Non-proline cis peptide bonds in proteins. J. Mol. Biol. *286*, 291–304.

Jancarik, J., and Kim, S.-H. (1991). Sparse matrix sampling: a screening method for crystallization of proteins. J. Appl. Crystallogr. *24*, 409–411.

Jones, T.A., Zou, J.Y., Cowan, S.W., and Kjeldgaard, M. (1991). Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. Acta Crystallogr. *A47*, 110–119.

Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J., and Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). Biochemistry *34*, 6003–6013.

Klein, A.R., Berk, H., Purwantini, E., Daniels, L., and Thauer, R.K. (1996). *Si*-face stereospecificity at C5 of coenzyme F_{420} for F_{420}-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis* and F_{420}-dependent alcohol dehydrogenase from *Methanoculleus thermophilicus*. Eur. J. Biochem. *239*, 93–97.

Kleywegt, G.J., and Jones, T.A. (1996). xdlMAPMAN and xdlDATAMAN—programs for reformatting, analysis and manipulation of biomacromolecular electron-density maps and reflection data sets. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *52*, 826–828.

Kraulis, P.J. (1991). MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. J. Appl. Crystallogr. *24*, 946–950.

Laskowski, R.A., MacArthur, M.W., Moss, D.S., and Thornton, J.M. (1993). PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. J. Appl. Crystallogr. *26*, 283–291.

Levitt, D.G. (2001). A new software routine that automates the fitting of protein X-ray crystallographic electron-density maps. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *57*, 1013–1019.

Lim, L.W., Shamala, N., Mathews, F.S., Steenkamp, D.J., Hamlin, R., and Xuong, N.H. (1986). Three-dimensional structure of the iron-sulfur flavoprotein trimethylamine dehydrogenase at 2.4-Å resolution. J. Biol. Chem. *261*, 15140–15146.

Lin, L.Y., Sulea, T., Szittner, R., Vassilyev, V., Purisima, E.O., and Meighen, E.A. (2001). Modeling of the bacterial luciferase-flavin mononucleotide complex combining flexible docking with structure-activity data. Protein Sci. *10*, 1563–1571.

Lindqvist, Y. (1989). Refined structure of spinach glycolate oxidase at 2 Å resolution. J. Mol. Biol. *209*, 151–166.

Matthews, B.W. (1968). Solvent content of protein crystals. J. Mol. Biol. *33*, 491–497.

Moore, S.A., and James, M.N. (1994). Common structural features of the luxF protein and the subunits of bacterial luciferase: evidence for a (beta alpha)8 fold in luciferase. Protein Sci. *3*, 1914–1926.

Nolling, J., Ishii, M., Koch, J., Pihl, T.D., Reeve, J.N., Thauer, R.K., and Hedderich, R. (1995). Characterization of a 45-kDa flavoprotein and evidence for a rubredoxin, two proteins that could participate in electron transport from H_2 to CO_2 in methanogenesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. Eur. J. Biochem. *231*, 628–638.

Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. Methods Enzymol. *276*, 307–326.

Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H.Z., and Piepersberg, W. (1995). Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78–11. Mol. Microbiol. *16*, 1137–1156.

Purwantini, E., and Daniels, L. (1998). Molecular analysis of the gene encoding F_{420}-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis*. J. Bacteriol. *180*, 2212–2219.

Ravelli, R.B.G., Sweet, R.M., Skinner, J.M., Duisenberg, A.J.M., and Kroon, J. (1997). STRATEGY: a program to optimize the starting angle and scan range for X-ray data collection. J. Appl. Crystallogr. *30*, 551–554.

Rowland, P., Nielsen, F.S., Jensen, K.F., and Larsen, S. (1997). The crystal structure of flavin containing enzyme dihydroorotate dehydrogenase from *Lactococcus lactis*. Structure *5*, 239–252.

Schneider, T.R., and Sheldrick, G.M. (2002). Substructure solution with SHELXD. Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. *58*, 1772–1779.

Shima, S., Warkentin, E., Grabarse, W., Sordel, M., Wicke, M., Thauer, R.K., and Ermler, U. (2000). Structure of coenzyme F(420) dependent methylenetetrahydromethanopterin reductase from two methanogenic archaea. J. Mol. Biol. *300*, 935–950.

Stover, C.K., Warrener, P., VanDevanter, D.R., Sherman, D.R., Arain, T.M., Langhorne, M.H., Anderson, S.W., Towell, J.A., Yuan, Y., McMurray, D.N., et al. (2000). A small-molecule nitroimidazopyran drug candidate for the treatment of tuberculosis. Nature *405*, 962–966.

Thauer, R.K. (1998). Biochemistry of methanogenesis: a tribute to Marjory Stephenson. Microbiol. *144*, 2377–2406.

van Der Ploeg, J.R., Iwanicka-Nowicka, R., Bykowski, T., Hryniewicz, M.M., and Leisinger, T. (1999). The *Escherichia coli* ssuEADCB gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl. J. Biol. Chem. *274*, 29358–29365.

Vaupel, M., and Thauer, R.K. (1995). Coenzyme F_{420}-dependent N5,N10-methylenetetrahydromethanopterin reductase (Mer) from *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain Marburg. Cloning, sequencing, transcriptional analysis, and functional expression in *Escherichia coli* of the mer gene. Eur. J. Biochem. *231*, 773–778.

Widdel, F., and Wolfe, R.S. (1989). Expression of secondary alcohol dehydrogenase in methanogenic bacteria and purification of the F_{420}-specific enzyme from *Methanogenium thermophilum* strain TCI. Arch. Microbiol. *152*, 322–328.

Accession Numbers

The atomic coordinates for coenzyme F_{420}-dependent alcohol dehydrogenase Adf from *M. thermophilicus* have been deposited in the Protein Data Bank with the accession code 1RHC.

Biochemistry, submitted for publication on September 20, 2004

Crystal structure of Mer in complex with coenzyme F_{420}: Architecture of F_{420}/FMN binding sites of enzymes within the non-prolyl *cis*-peptide containing bacterial luciferase subfamily[†‡]

Stephan W. Aufhammer[§], Eberhard Warkentin[‖], Ulrich Ermler[‖*], Christoph H. Hagemeier[§], Rudolf K. Thauer[§] and Seigo Shima[§*]

Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie and Laboratorium für Mikrobiologie, Fachbereich Biologie, Philipps-Universität, Karl-von-Frisch Strasse, D-35043 Marburg, Germany and Max-Planck-Institut für Biophysik, Marie Curie-Strasse 15, D-60596 Frankfurt/Main, Germany

Received September 20, 2004

ABSTRACT: F_{420}-dependent methylenetetrahydromethanopterin reductase (Mer) is a member of the bacterial luciferase family, which includes FMN- and F_{420}-dependent oxidoreductases. The enzymes in this family share an $(\alpha\beta)_8$ barrel fold, and some of them contain a non-prolyl *cis*-peptide bond that is rare in proteins. We report here the crystal structure of Mer from *Methanosarcina barkeri* (bMer) in complex with F_{420} at 2.6 Å resolution. The binding mode of F_{420} is similar to that of F_{420}-dependent alcohol dehydrogenase (Adf) from *Methanoculleus thermophilicus* despite the low sequence identity between the two enzymes. In particular, the pronounced 'butterfly' conformation of the isoalloxazine ring caused by a non-prolyl *cis*-peptide is well conserved. The presumed common flavin binding mode in the luciferase family and the observation that the flavin binding site is already preconstructed in the apoenzyme of Mer were exploited to build an improved model for FMN in bacterial luciferases. Implications of the new FMN model for the luciferase bioluminescence reaction are discussed. An approximate modeling of methylene-H_4MPT in front of the *Si*-face of F_{420} allowed the proposal of a hydride transfer mechanism, which postulates 5-iminium cation intermediate state with Glu6 and Asp96 as key residues in agreement with that of the NADP-dependent FAD harboring N^5,N^{10}-methylenetetrahydrofolate reductase.

The bacterial luciferase family is a growing enzyme family that involves FMN- and F_{420}-dependent oxidoreductases using diverse substrates (*1*). FMN-dependent bacterial luciferase (LuxAB) (*2*), FMN-dependent alkanesulfonate monoxygenase (SsuD) (*3*), F_{420}-dependent methylenetetrahydromethanopterin reductase (Mer) (*4-9*), F_{420}-dependent alcohol dehydrogenase (Adf) (*1*), F_{420}-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacteria* (*10*), F_{420}-dependent oxido-reductase from *Streptomyces* (*11*) and F_{420}-dependent hydride transferase 1 from *Rhodococcus* (*12*) are known so far as members of this family. Crystal structures of LuxAB (*13, 14*), Mer (*15*), SsuD (*16*) and Adf (*1*) have recently been solved. Although the enzymes belonging to this enzyme family show low sequence identity (< 30%), the enzymes share a similar $(\alpha\beta)_8$ barrel fold (TIM barrel fold) (*17*).

F_{420} is a hydride carrier, which is found in methanogenic archaea, sulfate-reducing archaea, haloarchaea, mycobacteria, *Streptomyces*, cyanobacteria and some eukaryotes (*18*). This coenzyme is a deazaflavin derivative resembling

[†]This work was supported by the Max Planck Society and by the Fonds der Chemischen Industrie.

*To whom correspondence should be addressed. Phone: +49-6421-178122. Fax: +49-6421-178199. E-mail: shima@staff.uni-marburg.de (S.S) and Uli.Ermler@mpibp-frankfurt.mpg.de (U.E).

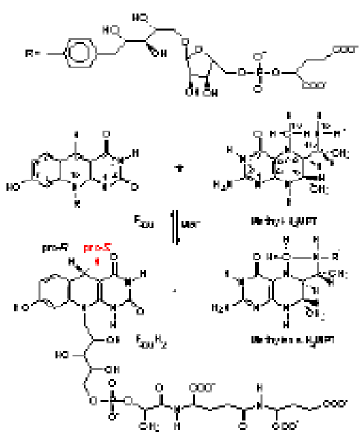
[§]MPI für terrestrische Mikrobiologie and Philipps-Universität.

[‖]MPI für Biophysik

[‡]The structure factors and atomic coordinates of bMer will be deposited to a protein data bank.

[1]Abbreviations: FMN, flavin mononucleotide; FAD, flavin adenine dinucleotide; F_{420}, coenzyme F_{420}; NADP, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; H_4MPT, tetrahydromethanopterin; methylene-H_4MPT, N^5,N^{10}-methylenetetrahydromethanopterin; methyl-H_4MPT, N^5-methyltetrahydromethanopterin; Mer, N^5,N^{10}-methylenetetrahydromethanopterin reductase; bMer, Mer from *Methanosarcina barkeri*; tMer, Mer from *Methanothermobacter marburgensis*; kMer, Mer from *Methanopyrus kandleri*; Adf, F_{420}-dependent alcohol dehydrogenase; Lux, bacterial luciferase; LuxA, alpha subunit of a bacterial luciferase; LuxAB, heterodimer of a bacterial luciferase; SsuD, FMN-dependent alkanesulfonate monoxygenase; MetF, NADP-dependent FAD harboring N^5,N^{10}-methylenetetrahydrofolate reductase; RMS, root mean square; RMSD, root mean square deviation; kDa, kilo Dalton; R_{cryst} and R_{free}, crystallographic refinement-factors; Å, Angström; C^{α}, alpha carbon atom; PEG, polyethylene glycol; PDB, protein data bank; Km, Michaelis constant; IR, insertion regions in the Mer structures.

flavins like FMN (Scheme 1). All F_{420}-dependent enzymes tested catalyze hydride transfer from or to the *Si*-face of F_{420} (*19*).



SCHEME 1: F_{420}-dependent methylenetetrahydromethanopterin reductase catalyzes the reduction of methylenetetrahydromethanopterin (Methylene-H_4MPT) to methyltetrahydromethanopterin (Methyl-H_4MPT) with the concomitant oxidation of $F_{420}H_2$ to F_{420}. The enzyme is *Si*-face specific with respect to the C5 atom of F_{420}. Coenzyme F_{420} is composed of a deazaflavin ring, a ribitol, a phosphate, a lactate and two or more glutamates. The C1 carrier H_4MPT is composed of 7-methyl-6-ethylpterin, aminobenzoate, 1-deoxyribose, ribose, phosphate and 2-hydroxyglutarate.

From the crystal structure of Adf in a complex with an adduct of F_{420} and acetone, the F_{420} binding site structure in this enzyme was determined (*1*). A non-prolyl *cis*-peptide bond was identified as an essential part of a bulge that serves as backstop to the *Re*-face of the F_{420} isoalloxazine ring. Although non-prolyl *cis*-peptide bonds are rare in proteins, it was also found in crystal structures of Mer (*15*) and LuxAB (*14*) at equivalent positions. This unusual *cis*-peptide bond was not found in SsuD (*16*) indicating that the bacterial luciferase family is composed of two subgroups: the *cis*-subfamily containing a non-prolyl *cis*-peptide bond and the *trans*-subfamily in which such a *cis*-peptide bond is absent like in SsuD. The isoalloxazine ring and the tail of F_{420} are fixed to the protein main chain of Adf mainly via hydrogen bonds. Except for His39 and Ser173, the hydrogen bonds are only formed to main chain atoms. Reflecting its binding mode, the sequence identity of the F_{420} binding site among the bacterial luciferase family enzymes is low (less than 30% in the total length of 14 amino acid residues).

Mer is found in methanogenic and sulfate reducing archaea (*5-9*) and catalyzes the reduction of N^5,N^{10}-methylenetetrahydromethanopterin (methylene-H_4MPT) to N^5-methyltetrahydromethanopterin (methyl-H_4MPT) with the concomitant oxidation of reduced F_{420} to oxidized F_{420} (Scheme 1). The cytoplasmic enzyme is composed of only one type of subunit with an apparent molecular mass between 35 and 40 kDa. It lacks a prosthetic group and exhibits a ternary complex mechanism. The crystal structures of Mer from thermophilic methanogens, *Methanopyrus kandleri* (kMer) and *Methanothermobacter marburgensis* (tMer) in the absence of their substrates have been reported (*15*). The $(\alpha\beta)_8$ barrel structure of Mer monomers is related to that of NADP-dependent FAD harboring N^5,N^{10}-methylenetetrahydrofolate reductase (MetF) from *Escherichia coli* (*20*), although both enzymes show no significant sequence similarity. Mer and MetF catalyze analogous reactions using similar substrates. The F_{420} binding site of Mer was predicted from the FAD binding mode in the structure of the MetF-FAD complex (*15*). Attempts to obtain the crystal structures of tMer and kMer in complex with the substrates have failed so far. Neither the cocrystallization of the enzyme with F_{420} under various screening conditions nor soaking of the crystals with the substrates yielded crystals of the complex.

Here, we present the structure of Mer from mesophilic *Methanosarcina barkeri* (bMer) in complex with F_{420}. This is the second structural example of F_{420} binding in enzymes of the bacterial luciferase family. The structure of the F_{420} binding site in Mer is identical to that in the structure of Adf despite the low sequence identity. Based on the F_{420} binding site structure of Mer, we predict the architecture of the FMN binding site in bacterial luciferase LuxA.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Materials. *Methanosarcina barkeri* strain Fusaro (DSMZ 804) was obtained from the Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (Braunschweig, Germany). Blue Sepharose CL-6B and Resource Q columns were from Amersham Biosciences. Coenzyme F_{420} and tetrahydromethanopterin (H_4MPT) were isolated from *Methanothermobacter marburgensis* (DSMZ 2133) (*21*). Initial screening experiments were performed with the Hampton Research crystallization kit (*22*). Figures 1 and 3 – 5 are generated with the programs Molscript (*23*), Bobscript (*24*), Raster 3D (*25*) and Pymol (DeLano Scientific).

Preparation of bMer. *M. barkeri* was grown in a medium containing 1% methanol at 37°C and cells

were harvested in the exponential phase (*26*). Cell extracts were prepared in 50 mM Tris/HCl, pH 7.6. All purification steps were performed in an anaerobic chamber (Coy) due to the inactivation of the enzyme under aerobic conditions. Methylenetetrahydromethanpoterin reductase (Mer) was purified using Blue Sepharose CL-6B and Resource Q chromatography columns as previously described (*7, 27*). Additionally, a Ceramic Hydroxyapatit column (BioRad) (14 ml) was applied which was equilibrated with 30 ml 0.03 M sodium phosphate buffer pH 6.0. bMer was eluted using a linear gradient of a sodium phosphate buffer (0.03 M- 0.5 M, 200 ml). The enzyme was recovered in the fractions at 0.5 M sodium phosphate. About 4 mg pure enzyme, with a specific activity of 250 U/mg at 55°C under standard assay conditions (*7*) could be isolated from 10 l culture. The purified enzyme was desalted and concentrated in a Centricon 10 microconcentrator (Amicon) and adjusted to a concentration of 13 mg/ml in MOPS/KOH (pH 7.0) supplemented with 0.1 M NaCl for subsequent crystallization. Precipitations that occurred during the enzyme concentration were removed by filtration (pore size: 0.45 µm).

Crystallization and Data Collection. Lyophilised F_{420} and H_4MPT were solved in 120 mM sodium phosphate buffer pH 6 under anaerobic conditions. Methylene-H_4MPT was gained from the spontaneous reaction of formaldehyde with H_4MPT (*7*). Shortly before crystallization, the enzyme was mixed with these substrates. The protein concentration was 9 mg/ml, in which the concentrations of F_{420} and of methylene-H_4MPT were 1.5 mM. The search for crystallization conditions was carried out in an anaerobic chamber with the crystallization kit at a temperature of 8°C using the hanging drop vapour diffusion method. Crystals grew best in a drop consisting of 1 µl enzyme solution containing the substrates and 1 µl of reservoir solution consisting of 0.1 M Tris/HCl, pH 8.5, 20 % polyethylene glycol (PEG) 4000 and 10 % isopropanol. Soaking buffer for freezing was the reservoir solution containing 20% glycerol as cryoprotectant. Crystals were mounted on a fiber loop and were flash frozen in a gaseous nitrogen stream (100 K). The space group was $P2_1$ and the lattice parameters were a = 81.8 Å, b = 83.4 Å, c = 99.2 Å, and β = 91.2 ° best compatible with one tetramer in the asymmetric unit (*28*). X-Ray data sets were collected at the European Synchroton Radiation Facility (ESRF), Grenoble, France at ID29 beamline using an ADSC Quantum 4 CCD detector. Diffraction data were collected under cryogenic conditions with a wavelength of 0.9792 nm. Processing and scaling of the reflections were performed with XDS package (*29*). The processing statistics: at a signal/noise value > 0 the resolution limits of the data set was 50-2.59 Å with a completeness of 97.1 %. R_{mrgd} was 29.2 % (total 10.3 %). A number of 40607 unique reflections and of 160780 total reflections were collected.

Phase Determination, Model Building and Refinement. Phases of bMer crystals were determined by the method of molecular replacement with the programs: AmoRe (30) and EPMR (31), using the coordinates of a tMer dimer (1F07). For refinement a model was generated with the SwissProt server (32) from the sequence of bMer and the structure of tMer. Refinement of the coordinates was performed with the crystallography and NMR system program (CNS) (33) using standard protocols. Manual corrections of the model were performed by examination of the ($2F_o$–F_c) and (F_o–F_c) maps with program O (34). A total of 239 solvent molecules were added using the water pick protocol implemented in CNS. Analysis of the bMer structure resulted in bond RMS deviations of 0.009 Å and angle RMS deviations of 1.5°.

RESULTS

Crystal Structure. The crystal structure of bMer was solved at 2.6 Å resolution by the molecular replacement method. The model was refined to R_{cryst}- and R_{free}-factors of 18.5 % and 22.1 %, respectively, in the resolution range 2.6-50 Å. The model in the asymmetric unit consists of 4 × 327 residues, 4 coenzyme F_{420} ligands, one polyethylene glycol molecule, 239 water molecules and two tentatively modelled potassium ions. In agreement with gel filtration results (*7*) bMer in the crystalline state was found to be a homotetramer similar to that observed in kMer crystal structure (*15*). The monomer of bMer consists of an $(\alpha\beta)_8$ barrel core and three insertion regions named IR1 (Pro94-Pro111), IR2 (Gly127-Pro152) and IR3 (Lys216-Pro285) (Figure 1 and 2). IR1 and IR3 consist mainly of helix α4-1 and the helical subdomains α7-1 - α7-5, respectively and constitute the walls of the F_{420} and methylene-H_4MPT binding cleft. As expected, the bulge at the end of strand β3 containing the non-prolyl *cis*-peptide bond between Gly61 and Val62 is also conserved in bMer. A superposition of the Mer monomers resulted in a root mean square deviation (RMSD) of 1.1 Å (bMer to tMer) and of 1.3 Å (bMer to kMer) for all C^{α} positions indicating their high structural relationship. The difference between the $(\alpha\beta)_8$ barrel cores is significantly smaller (RMSD of 0.6 Å) than between the insertion regions. Structural differences of IR1 and IR3 can be partly accounted for by the fact that bMer is present in complex with F_{420} and tMer and kMer without the coenzyme (see below).

Structural analysis of bMer revealed two sites of additional electron density that could not be

F_{420} Binding Site Structure

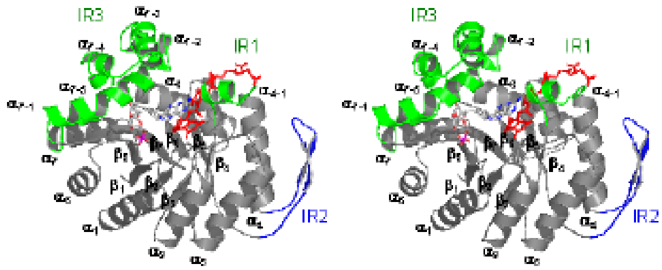


FIGURE 1: Stereo plot of the barrel fold of F_{420}-dependent methylentetrahydromethanopterin reducatse from *Methanosarcina barkeri* in monomeric form. The $(\alpha\beta)_8$ barrel core is presented in gray. Insertion regions (IR) are indicated in green (IR1 and IR3) and blue (IR2). IR1 and IR3 consist mainly of helix α4-1 and the helical subdomains α7-1 - α7-5, respectively. IR2 is composed of a loop between α4 and β5. These insertion regions have important functions in either binding of F_{420} (illustrated in red) and methylenetetrahydromethanopterin or in forming the interface between the subunits. The position of methylenetetrahydromethanopterin is modeled up to the phoshpate moiety. Its C/O/N/P atoms are colored in gray/red/blue/magenta, respectively.

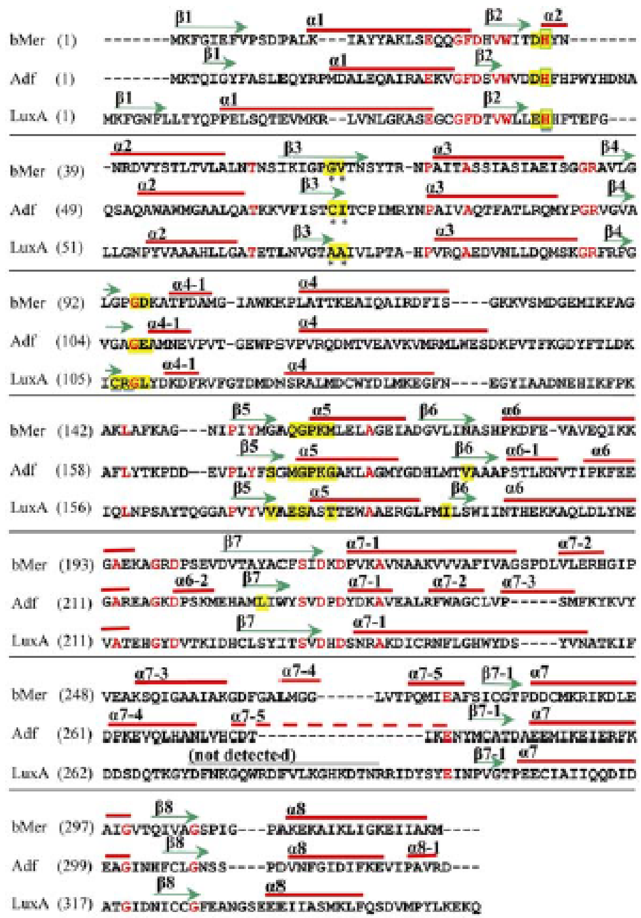


FIGURE 2: Sequence alignment of F_{420}-dependent methylentetrahydromethanopterin reducatse from *Methanosarcina barkeri* (bMer), F_{420}-dependent alcohol dehydrogenase from *Methanoculleus thermophilicus* (Adf) and FMN-dependent bacterial luciferase from *Vibrio harveyi* (LuxA). Conserved residues are colored in red. Arrows and bars above indicate the secondary structure assignments of each sequence. Residues involved in F_{420} or FMN binding are highlighted in yellow. The amino acid residues at non-prolyl *cis*-peptide bonds are indicated with asterisks. Histidine which bound to the F_{420} isoalloxazine ring is boxed in green. His44, Cys106 and Arg107 of LuxA are underlined. A part of the structure was not visible in the electron density of LuxA.

interpreted as solvent molecules. The first electron density peak is located close to residue His36 in the substrate binding cleft of one of the monomers in the asymmetric unit and could be assigned as a polyethylene glycol (PEG) molecule (data not shown). The PEG molecule is primarily linked to the protein by a hydrogen bond between its oxygen atom and the His36-N^{ε} atom and by hydrophobic interaction to Phe250, which is reoriented upon PEG binding. Bound PEG molecules have also been reported in other protein structures (*35, 36*). The second electron density patch is 6 Å long and is attached to the C5 atom of F_{420} and protrudes perpendicularly to its *Si*-face (Figure 3). The presence of a covalent F_{420}-ligand adduct proves that F_{420} is in a reduced state. A similar covalent adduct was observed in the structure of the Adf-F_{420} complex, in which the additional molecule was characterized as an acetone molecule (*1*). However, an acetone molecule would be too small to explain the electron density found in bMer.

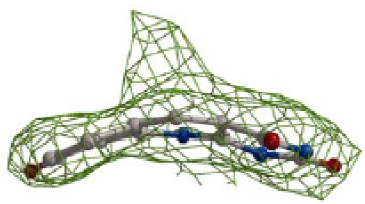


FIGURE 3: The $2F_{obs}$-F_{calc} electron density (contour level 1.0σ) of the part of F_{420} isoalloxazine ring in the 2.6 Å crystal structure of F_{420}-dependent methylentetrahydromethanopterin reducatse from *Methanosarcina barkeri*. An additional electron density was found at the C5 of the ring. Only a part of the unknown molecule is shown.

F_{420} Binding Mode. F_{420} binds rigidly and with an occupancy of about 80% into a cleft built up of strands β2, β5, β6, β7, and IR1 (Figure 1). Its binding mode is distinct from that of FAD in the analogous MetF structure despite its related position in front of the C-terminal end of the $(\alpha\beta)_8$ barrel. But F_{420} binds similarly to that reported for Adf (*1*), as reflected by a low RMSD of 2.3 Å between bMer and Adf using 302 of the 330 C^{α} atoms for superposition (*37*). The structure-based sequence identity between both enzymes is 25% and the sequence identity is 21% (See Figure 2).

The pronounced butterfly conformation of the isoalloxazine ring found in Adf is strictly conserved in bMer, the bending angle being 27° (Figure 3). Nevertheless, the direct environment of the isoalloxazine rings differs slightly. At the *Si*-side of Adf unpolar residues constitute the isopropanol binding site and partially shield the isoalloxazine ring whereas at the *Si*-side of bMer a few more polar residues allow sufficient space for binding of the large methylene-H_4MPT head (Figure 4). In contrast, the structure at the *Re*-side including the bulge with the nonprolyl *cis*-peptide bond is well conserved. Considerable rearrangements are also observed around the hydroxybenzyl group of the isoalloxazine ring. The hydroxyl group is hydrogen-bonded to the peptide carbonyl oxygen of Asn176 in bMer but only weakly linked to Ser173 in Adf. The reason might be that the bent conformation of the isoalloxazine ring is predominantly maintained by electrostatic interactions to the hydroxybenzyl ring in bMer and by steric restraints in Adf. The connection between the pyrimidine ring and the protein matrix is rather conserved in both enzymes. An additional hydrogen bond is formed between Asp96 and O2 in bMer (Figure 4).

The position and conformation of the F_{420} substituent as well as its interaction to the protein are similar for the ribitol and phosphate groups in bMer and Adf. The residual substituent differs substantially although both carboxylate groups of the first glutamate have a similar binding site, the N-terminal residues of helix α5. In the bMer structure the whole substituent was clearly visible in the electron density in contrast to the Adf-F_{420} complex structure where the second glutamate moiety of the substituent of F_{420} was not detectable in the electron density (*1*) and appears to be completely solvent exposed. In bMer, the second glutamate was anchored to the protein matrix by interactions to the peptide nitrogens of Lys161 and Ala112 located at the N-terminal end of helix α4 (Figure 4).

Conformational change of Mer upon F_{420} binding. A structural comparison between bMer complexed with F_{420} and tMer and kMer without the coenzyme clearly revealed that the F_{420} binding site is preconstructed in the apoenzyme. The only significant main chain alteration involves IR1, which moves at most 2 Å towards the coenzyme upon F_{420} binding. The size of the binding sites differs between tMer and kMer in the asymmetric units. In contrast to this conformational variability, the four crystallographically unrelated bMer molecules (RMSD about 0.8 Å) revealed an identical conformation of IR1 reflecting the rigidity of IR1 upon F_{420} binding. The observed movement is required to position residues like Trp107 and Pro110 of the loop following helix α4-1 in van der Waals distance to the substituent of F_{420}. Interestingly, Asp96 of IR1 prior to F_{420} binding is hydrogen-bonded to Ala98 and Thr99, whereas afterwards it points towards the bulk solvent in front of F_{420} and becomes more flexible. Furthermore, the side chains of His39, Gln158, Leu174, Asn176 and Tyr209 protrude into the

F_{420} Binding Site Structure

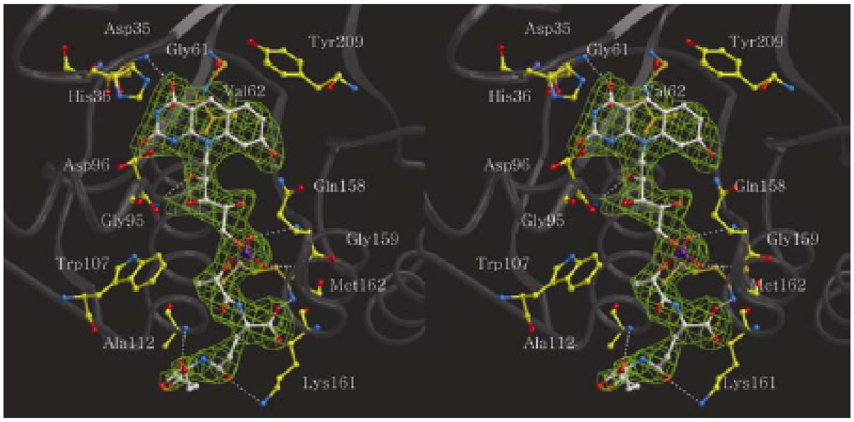


FIGURE 4: Stereo plot showing the interactions between the coenzyme F_{420} molecule and F_{420}-dependent methylentetrahydromethanopterin reducatse from *Methanosarcina barkeri*. F_{420} is linked to the protein matrix by seven direct hydrogen bonds. The isoalloxazin ring is linked to Asp35 and His36. The non-prolyl *cis*-peptide bond, formed by Gly61 and Val62 balances the isoalloxazin ring at its *Re*-face. The ribitol group is linked to Gly95 and the phosphate is in hydrogen-bond distance to Gln158 and Gly159. Trp107 provides hydrophobic interaction to the lactate part of F_{420}. The first glutamate of the tail is bound to Met162 and Lys161 and the second gluatamate to Asp112.

isoalloxazine binding site and evade the arriving coenzyme F_{420}. Sidechains Gln158 and Asn176 also become more flexible upon F_{420} binding.

Modeling of FMN into LuxA. Despite an insignificant sequence identity between LuxA from *Vibrio harveyi* (*13*) and bMer (16%), the structures of both enzymes are related as indicated by an RMSD of 2.7 Å when using 292 of the 340 C^{α} atoms for superposition by DALI (*37*) (Figure 5A). Two crystal structures of Lux A are available: 1BRL at 2.5 Å resolution and 1LUC at 1.5 Å resolution. Although the general accuracy of the 1.5 Å structure is improved, allowing the detection of the non-prolyl *cis*-peptide bond, we used the 2.5 Å structure for constructing a model since the presence of Pi bound to the enzyme changes the conformation such as is expected for FMN binding. Accordingly, modeling of FMN into LuxA was straightforward by transferring F_{420} from bMer into the superimposed LuxA and by changing it to FMN (Figure 5B). Except for Leu109 the distances between FMN and proteins atoms are longer than 2 Å indicating only minor interference. After incorporating a *cis*-peptide bond between Ala74 and Ala75, and after rotating His39 into the position found in bMer and after rotating Leu109 to a position corresponding to that found in the 1.5 Å structure of luciferase, a energy minimization calculation was performed using CNS (*33*). The RMSD of the model around FMN before and after energy minimization was 0.6 Å; no atoms deviate more than 1 Å. The bent conformation of the isoalloxazine ring and the non-prolyl *cis*-peptide bond was retained. As visualized in Figure 5C, the essential flavin-protein interactions conserved between bMer and Adf are maintained in luciferase. However, the surrounding of the dimethylbenzyl group is significantly changed compared to that of the hydroxybenzyl group of Mer. Val173 and Ile191 provide hydrophobic contacts with the methyl groups at C7 and C8 of FMN and might also play a role in maintaining the butterfly conformation. Recently, Lin *et al.* reported that mutations at Val173 affected the color of bioluminescence emission and/or the reaction kinetics of luciferase catalysis (*38*). Other mutational studies indicated that residues Asp113, Ser227, Trp194 and Trp250 influence isoalloxazine binding which is completely compatible with our model (*39*). Interestingly, the phosphate molecule found in LuxA is only 1.2 Å and 0.8 Å apart from the independently modeled phosphate groups of F_{420} in bMer and Adf, respectively. Mutations of Arg107, which is hydrogen bonded to the phosphate group in our FMN model, to neutral or negatively charged amino acids led to an increased K_m value for reduced FMN (*40, 41*) thereby supporting the correct positioning of the phosphate group.

The methylene-H_4MPT binding site. Methylene-H_4MPT was not found in the crystal structure although the crystals were grown in the presence of methylene-H_4MPT and F_{420}. We assume that the unknown bulky molecule at the C5 position of F_{420} partly occupies the binding site of the pterin and imidazolidine rings and thus prevents the binding of methylene-H_4MPT. However, analyses of the Mer structures provide us with a variety of information, which can be used to postulate how methylene-H_4MPT binds (Figure 1). The determined position

F_{420} Binding Site Structure

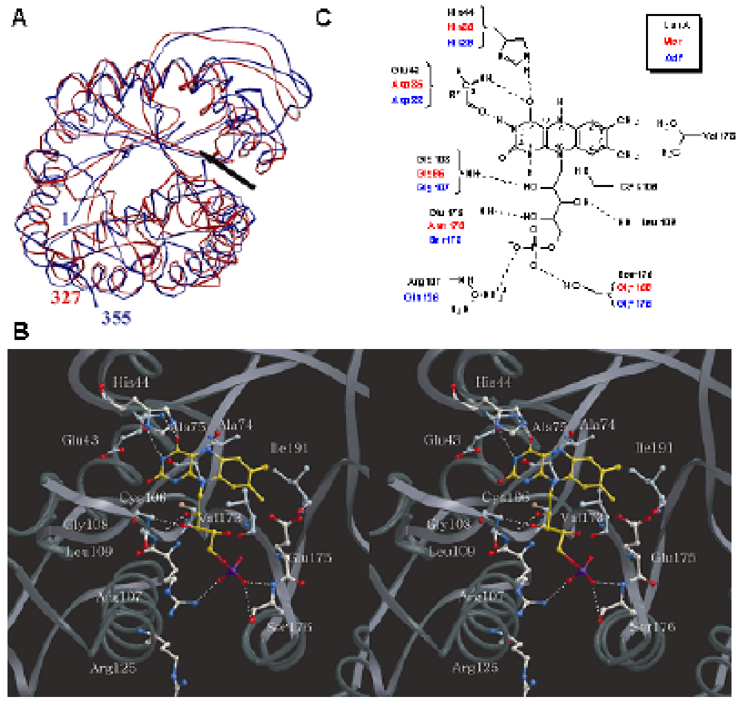


FIGURE 5: Modeling of FMN into the bacterial luciferase α subunit (LuxA) from *Vibrio harveyi*. (A) Superposition of the C^{α} chains of Mer from *Methanosarcina barkeri* and LuxA. The arrows show the protein segments for the F_{420}/FMN binding pockets. (B) Stereoviews of the modeled complex of FMN with LuxA. The FMN ligand is shown in ball-and-stick representation. Its C/O/N/P atoms are colored in yellow/red/blue/magenta, respectively. Selected protein residues lining in the binding site and discussed in the text are shown as ball-and-stick representation and are labeled. Intermolecular hydrogen bonds between the FMN molecule and the protein are shown by white dashed lines. The backbone of the protein is colored in gray. (C) Scheme of the proposed FMN binding mode in LuxA. Residues contacting F_{420} in Mer and Adf are indicated in red and blue, respectively. Conserved residues contacting the coenzyme (F_{420} or FMN) are shown by brackets. Intermolecular hydrogen bonds between the coenzyme molecule and the protein are shown by dashed lines. Some additional specific contacts are found in the three enzymes. The *cis*-peptide bond-forming residues are not shown.

of F_{420} serves as fixpoint to position the head group of methylene-H_4MPT as its C14a atom has to be within a distance of 3.0 - 3.5 Å of the C5 atom of F_{420} for optimal hydride transfer. For sterical reasons the bulky head group has to be placed at the *Si*-face of F_{420}. A hydride transfer at the *Si*-face is also in agreement with previous studies (*42*).

The polar residues Glu6, His36, Asp96, Gln158 and Asn176 which are well conserved in all known Mer sequences (*15*) change their conformations upon F_{420} binding and protrude towards the potential pterin and imidazolidine binding site. The latter three residues become more flexible upon F_{420} binding and might be involved in methylene-H_4MPT binding upon which they are no longer flexible. This finding suggests that F_{420} has to be bound at first to the enzyme to form the binding site for methylene-H_4MPT. Additionally, Glu6, Asp96 and Gln158 are similarly arranged with respect to the flavin as the corresponding residues Glu25, Asp120 and Gln183 of MetF. The latter residues were shown to be involved in tetrahydrofolate binding by site-specific mutagenesis experiments (*43*).

The analysis of the protein surface suggests that the binding site of the pterin substituent of methylene-H_4MPT is located in a cleft between the TIM barrel core and IR3 most likely between the C-terminal regions of strands β1 + β8 and helix α7-1 (Figure 1). The participation of IR3 in methylene-H_4MPT binding was previously proposed (*15*) since its conformation differs between the crystal structures and it is partially disordered in the crystal of kMer. Additionally, the side of the cleft that is

formed by IR3 is lined by several solvent exposed hydrophobic side chains including the invariant Val228, Phe231, Ile232 and Phe263. These rather hydrophobic residues are involved in binding a PEG molecule, approximately outlining the binding site for the pterin substituent of methylene-H_4MPT.

DISCUSSION

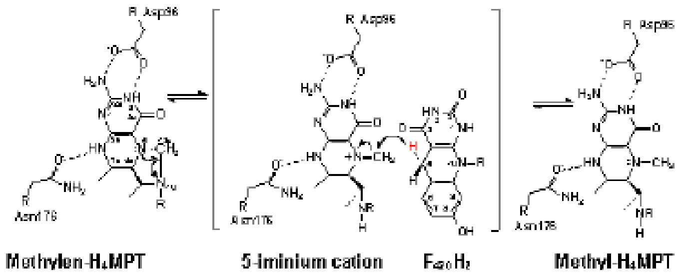
The structure of bMer in complex with F_{420} reported here is the second enzyme in the bacterial luciferase family where the flavin could be detected in the electron density. Despite the low sequence identity between Mer and Adf and a few modifications of the F_{420}-binding site the position and conformation of F_{420} was remarkably conserved. Moreover, F_{420} binding induces only minor conformational changes of the polypeptide such that the F_{420} binding site can be considered to be preconstructed prior to F_{420} binding. Both findings prompted us to model the FMN molecule into the structure of the structurally related and biologically interesting bacterial luciferase subunit LuxA. Additionally, the accurate F_{420} binding position combined with some features of the substrate binding cleft allowed us to model methylene-H_4MPT into its binding site in bMer (see below).

The new FMN model and its implication for the LuxA reaction. LuxA catalyzes the reaction of reduced FMN, molecular oxygen, and a long chain aliphatic aldehyde to yield oxidized FMN, aliphatic carboxylic acid and blue-green light (*2*). The binding mode for FMN and aliphatic aldehyde substrates are still not experimentally established but a model for FMN was proposed based on computer assisted conformational search methods (*41*) with incorporation of the mutational data and the inorganic phosphate binding site (*40, 41, 44, 45*). The FMN binding position derived by modelling based on the structure of the bMer-F_{420} complex is similar to that obtained via computations. However, the orientation of the isoalloxazine ring differs substantially. For example, the non-prolyl *cis*-peptide oxygen approximately points towards atom N5 of FMN, whereas this oxygen serves as a backstop for the ring in our model. Furthermore, the conformation of the reduced isoalloxazine ring in LuxA was considered to be planar based on nuclear magnetic resonance (NMR) spectra (*46*). We favor, in contrast, a bent conformation of the flavin ring in LuxA, as observed in bMer and Adf (Figure 3 and 5B). A bent conformation of FMN would be compatible with the conformation of FMN and FAD found in other enzymes (*47, 48*) and with energy calculations of flavins (*49*). In addition, the ribitol linker does not form intramolecular hydrogen bonds with the phosphate in our model (Figure 5B).

The new model of FMN also provides us with new information about the function of crucial residues that might contribute to a better understanding of the luciferase reaction. The most striking observation is the pronounced butterfly conformation of the isoalloxazine ring that increases the space in front of atom C4a. The bending of flavin ring raises C4a out of the plane forces it to rehybridize. With binding hydoperoxy or hydroxy in its intermediate states, an sp3 hybridization is reached. Whether the bent conformation and its potential alteration can be correlated with the bioluminescence property of luciferase is, of course, an open question. The importance of the non-prolyl cis-peptide bond for isoalloxazine binding was recognized previously (*41*) but its specific function to maintain a bent conformation is only now evident. Therefore, the dramatic effect of the Cys106Val mutant might be due to a collision between the side chains of Val106 and *cis*-peptide forming Ala75 thereby distroying the butterfly conformation of FMN. In the bMer derived model, the thiol group of Cys106 has a distance of 3.2 Å to the N1 atom of F_{420} and is not directly involved in the bioluminescence reaction in agreement with previous results (*44*). Nevertheless, Cys106 of *Vibrio harveyi* luciferase could stabilize the deprotonated N1 atom, increasing the nucleophilicity of atoms N5 and C4a and stabilizing the C4a-hydroperoxy and hydroxy-intermediate states of the flavin (*44, 50*). From the structural point of view the most interesting residue is His44, which was rotated towards the *Si*-side of the isoalloxazine ring in accordance with the conformation found in bMer and Adf. In this position the imidazole ring would be directly in contact with the postulated covalent flavin adducts and might act as a catalytic acid or a catalytic base. These results are in agreement with mutagenesis experiments that already showed the important role of His44 for bioluminescence activity and on aldehyde consumption (*45*). The function of His44 as a catalytic base was also previously proposed (*51*).

Modeling of methylene-H_4MPT and the catalytic mechanism of Mer. Based on the determined position of F_{420}, the known stereochemistry of the hydride transfer and the described properties of the substrate binding cleft, a reasonable model of methylene-H_4MPT could be built (Figure 1). The conformation of methylene-H_4MPT was taken from that of the formaldehyde-activating enzyme, the first structure solved with methylene-H_4MPT bound (*52*). Accordingly, the pterin and imidazoline rings were placed in such a manner that the *Re*-side of methylene-H_4MPT faces the *Si*-side of F_{420} such that the C14a – C5 distance is 3.2 Å. The pterin,

F_{420} Binding Site Structure



SCHEME 2. Proposed mechanism of the reaction catalyzed by F_{420}-dependent methylentetrahydromethanopterin reducatse. The first step is an acid-catalyzed opening of the imidazolidine ring to form the more reactive 5-iminium cation. Glu6 donates a proton towards atom N10 at this step (Glu6 is not shown in this scheme). Asp96 stabilizes the positive charge of the reactive 5-iminium cation. Asn176 binds the pterin ring by a hydrogen bonding. The pro-*S* hydride is transferred to the 5-iminium cation forming methyl-H_4MPT.

imidazolidine and benzyl rings were additionally oriented such that the N3 and N8 atoms lie adjacent to the pronounced residues Asp96 and Asn176 without causing larger collisions between the bulky rings and the protein matrix. In this position of the pterin ring, the N10 atom is 4.2 Å away from Glu6 and is able to form a hydrogen bond to it after a conformational change of its side chain or via a solvent molecule. Moreover, His39 is hydrogen bonded to the O4 atom of the pterin ring and the flexible Gln58 might also be involved in pterin binding.

When keeping the acute angle between the pterin and imidazolidine rings similar to that found in Fae, the benzyl, ribitol and ribose moieties of methylene-H_4MPT approximately superimposes with the PEG found in the structure. This coincidence supports the reliability of the model. However, the binding cleft is too wide for optimal cofactor-protein contacts therefore a 2 – 3 Å movement of IR3 towards methylene-H_4MPT is likely. After shifting IR3 the aromatic side chain of Phe231 roughly faces the benzyl ring of H_4MPT and Val228 + Ile232 might contact the pterin and imidazolidine ring from the *Si*-side. Phe263 might have a role in fixing the ribose group of methylene-H_4MPT.

The modeling of methylene-H_4MPT allows postulation of a hydride transfer mechanism for Mer as outlined in Scheme 2. Accordingly, the reaction might be initiated by an acid-catalyzed opening of the imidazolidine ring and Glu6 might donate a proton towards atom N10. Then the formed 5-iminium cation could readily accept a hydride ion from reduced F_{420} generating methyl-H_4MPT. Asp96 is the most attractive candidate to stabilize the positive charge of the reactive 5-iminium cation but the imidazole ring of His36 pointing to the C14a atom might also have an important catalytic function. The proposed mechanism corresponds to that reported for MetF (*43*) and thymidylate synthase (*53*). In MetF the essential role of the equivalent Glu28 and Asp120 for folate activation and catalysis was confirmed by site-directed mutation experiments (*43*).

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Hartmut Michel for generous support, Peter Haebel for introducing us to AutoDock, Erica J. Lyon for reading of the manuscript and Emanuela Screpanti, Carola Hunte and the members of the ID29 beam line at ESRF for help during data collection.

REFERENCES

1. Aufhammer, S. W., Warkentin, E., Berk, H., Shima, S., Thauer, R. K., and Ermler, U. (2004) Coenzyme binding in F_{420}-dependent secondary alcohol dehydrogenase, a member of the bacterial luciferase family, *Structure 12*, 361-370.

2. Baldwin, T. O., Ziegler, M. M., and Powers, D. A. (1979) Covalent structure of subunits of bacterial luciferase: NH_2-terminal sequence demonstrates subunit homology, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 76*, 4887-4889.

3. van Der Ploeg, J. R., Iwanicka-Nowicka, R., Bykowski, T., Hryniewicz, M. M., and Leisinger, T. (1999) The *Escherichia coli ssuEADCB* gene cluster is required for the utilization of sulfur from aliphatic sulfonates and is regulated by the transcriptional activator Cbl, *J. Biol. Chem. 274*, 29358-29365.

4. Shima, S., Warkentin, E., Thauer, R. K., and Ermler, U. (2002) Structure and function of enzymes involved in the methanogenic pathway utilizing carbon dioxide and molecular hydrogen, *J. Biosci. Bioeng. 93*, 519-530.

5. Vaupel, M., and Thauer, R. K. (1995) Coenzyme F_{420}-dependent N^5,N^{10}-methylenetetrahydromethanopterin reductase (Mer) from *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain Marburg. Cloning, sequencing, transcriptional analysis, and functional expression in *Escherichia coli* of the *mer* gene, *Eur. J. Biochem. 231*, 773-778.

6. Ma, K., and Thauer, R. K. (1990) Purification and properties of N^5, N^{10}-methylenetetrahydromethanopterin reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* (strain Marburg), *Eur. J. Biochem. 191*, 187-193.

F_{420} Binding Site Structure

7. Ma, K., and Thauer, R. K. (1990) *N*[5],*N*[10]-Methylenetetrahydromethanopterin reductase from *Methanosarcina barkeri*, *FEMS Microbiol. Lett. 70*, 119-124.
8. Ma, K., Linder, D., Stetter, K. O., and Thauer, R. K. (1991) Purification and properties of *N*[5],*N*[10]-methylenetetrahydromethanopterin reductase (coenzyme F_{420}-dependent) from the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*, *Arch. Microbiol. 155*, 593-600.
9. te Brommelstroet, B. W., Hensgens, C. M. H., Keltjens, J. T., van der Drift, C., and Vogels, G. D. (1990) Purification and properties of 5,10-methylenetetrahydromethanopterin reductase, a coenzyme F_{420}-dependent enzyme, from *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain D H, *J. Biol. Chem. 265*, 1852-1857.
10. Purwantini, E., and Daniels, L. (1998) Molecular analysis of the gene encoding F_{420}-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis*, *J. Bacteriol. 180*, 2212-2219.
11. Peschke, U., Schmidt, H., Zhang, H. Z., and Piepersberg, W. (1995) Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11, *Mol. Microbiol. 16*, 1137-1156.
12. Heiss, G., Hofmann, K. W., Trachtmann, N., Walters, D. M., Rouviere, P., and Knackmuss, H. J. (2002) *npd* gene functions of *Rhodococcus* (*opacus*) *erythropolis* HL PM-1 in the initial steps of 2,4,6-trinitrophenol degradation, *Microbiology 148*, 799-806.
13. Fisher, A. J., Raushel, F. M., Baldwin, T. O., and Rayment, I. (1995) Three-dimensional structure of bacterial luciferase from *Vibrio harveyi* at 2.4 Å resolution, *Biochemistry 34*, 6581-6586.
14. Fisher, A. J., Thompson, T. B., Thoden, J. B., Baldwin, T. O., and Rayment, I. (1996) The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions, *J. Biol. Chem. 271*, 21956-21968.
15. Shima, S., Warkentin, E., Grabarse, W., Sordel, M., Wicke, M., Thauer, R. K., and Ermler, U. (2000) Structure of coenzyme F_{420} dependent methylenetetrahydromethanopterin reductase from two methanogenic archaea, *J. Mol. Biol. 300*, 935-950.
16. Eichhorn, E., Davey, C. A., Sargent, D. F., Leisinger, T., and Richmond, T. J. (2002) Crystal structure of *Escherichia coli* alkanesulfonate monooxygenase SsuD, *J. Mol. Biol. 324*, 457-468.
17. Banner, D. W., Bloomer, A. C., Petsko, G. A., Phillips, D. C., Pogson, C. I., Wilson, I. A., Corran, P. H., Furth, A. J., Milman, J. D., Offord, R. E., Priddle, J. D., and Waley, S. G. (1975) Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angstrom resolution using amino acid sequence data, *Nature 255*, 609-614.
18. DiMarco, A. A., Bobik, T. A., and Wolfe, R. S. (1990) Unusual coenzymes of methanogenesis, *Annu. Rev. Biochem. 59*, 355-394.
19. Thauer, R. (1997) Biodiversity and unity in biochemistry, *Antonie Van Leeuwenhoek 71*, 21-32.
20. Guenther, B. D., Sheppard, C. A., Tran, P., Rozen, R., Matthews, R. G., and Ludwig, M. L. (1999) The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia, *Nat. Struct. Biol. 6*, 359-365.
21. Shima, S., and Thauer, R. K. (2001) Tetrahydromethanopterin-specific enzymes from *Methanopyrus kandleri*, *Methods Enzymol. 331*, 317-353.
22. Jancarik, J., and Kim, S.-H. (1991) Sparse matrix sampling: A screening method for crystallization of proteins., *J. Appl. Crystallogr. 24*, 409-411.
23. Kraulis, P. J. (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures, *J. Appl. Crystallogr. 24*, 946-950.
24. Esnouf, R. M. (1997) An extensively modified version of MOLSCRIPT that includes greatly enhanced coloring capabilities, *J. Mol. Graph. 15*, 133-138.
25. Bacon, D. J., and Anderson, W. F. (1988) A Fast Algorithm for Rendering Space-Filling Molecule Pictures, *J. Mol. Graph. 6*, 219-220.
26. Karrasch, M., Borner, G., Enssle, M., and Thauer, R. K. (1989) Formylmethanofuran dehydrogenase from methanogenic bacteria, a molybdoenzyme, *FEBS Lett. 253*, 226-230.
27. Ma, K., and Thauer, R. K. (1990) Single step purification of methylenetetrahydromethanopterin reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* by specific binding to blue sepharose CL-6B, *FEBS Lett. 268*, 59-62.
28. Matthews, B. W. (1968) Solvent content of protein crystals, *J. Mol. Biol. 33*, 491-497.
29. Kabsch, W. J. (1988) Automatic indexing of rotation diffraction patterns, *J. Appl. Crystallogr. 21*, 67-71.
30. Navaza, J. (1994) AMoRe: an automated package for molecular replacement, *Acta Crystallogr., Sect. A 50*, 157-163.
31. Kissinger, C. R., Gehlhaar, D. K., and Fogel, D. B. (1999) Rapid automated molecular replacement by evolutionary search, *Acta Crystallogr., Sect. D 55*, 484-491.
32. Schwede, T., Kopp, J., Guex, N., and Peitsch, M. C. (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server, *Nucleic Acids Res. 31*, 3381-3385.
33. Brunger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J. S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination, *Acta Crystallogr., Sect. D 54*, 905-921.
34. Jones, T. A., Zou, J. Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models., *Acta Crystallogr., Sect. A 47*, 110-119.
35. Becker, A., Schlichting, I., Kabsch, W., Schultz, S., and Wagner, A. F. (1998) Structure of peptide deformylase and identification of the substrate binding site, *J. Biol. Chem. 273*, 11413-11416.
36. Pylypenko, O., Vitali, F., Zerbe, K., Robinson, J. A., and Schlichting, I. (2003) Crystal structure of OxyC, a cytochrome P450 implicated in an oxidative C-C coupling reaction during vancomycin biosynthesis, *J. Biol. Chem. 278*, 46727-46733.
37. Holm, L., and Sander, C. (1993) Protein structure comparison by alignment of distance matrices, *J. Mol. Biol. 233*, 123-138.
38. Lin, L. Y., Szittner, R., Friedman, R., and Meighen, E. A. (2004) Changes in the kinetics and emission spectrum on mutation of the chromophore-binding platform in *Vibrio harveyi* luciferase, *Biochemistry 43*, 3183-3194.
39. Baldwin, T. O., Christopher, J. A., Raushel, F. M., Sinclair, J. F., Ziegler, M. M., Fisher, A. J., and Rayment, I. (1995) Structure of bacterial luciferase, *Curr. Opin. Struct. Biol. 5*, 798-809.
40. Moore, C., Lei, B., and Tu, S. C. (1999) Relationship between the conserved alpha subunit arginine 107 and effects of phosphate on the activity and stability of *Vibrio harveyi* luciferase, *Arch. Biochem. Biophys. 370*, 45-50.
41. Lin, L. Y., Sulea, T., Szittner, R., Vassilyev, V., Purisima, E. O., and Meighen, E. A. (2001) Modeling of the bacterial luciferase-flavin mononucleotide complex combining flexible docking with structure-activity data, *Protein Sci. 10*, 1563-1571.
42. Kunow, J., Schwörer, B., Setzke, E., and Thauer, R. K. (1993) *Si*-face stereospecificity at C5 of coenzyme F_{420} for F_{420}-dependent *N*[5],*N*[10]-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, F_{420}-dependent *N*[5],*N*[10]-methylenetetrahydromethanopterin reductase and $F_{420}H_2$:dimethylnaphthoquinone oxidoreductase, *Eur. J. Biochem. 214*, 641-646.
43. Trimmer, E. E., Ballou, D. P., Ludwig, M. L., and Matthews, R. G. (2001) Folate activation and catalysis in methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli*: roles for aspartate 120 and glutamate 28, *Biochemistry 40*, 6216-6226.
44. Abu-Soud, H. M., Clark, A. C., Francisco, W. A., Baldwin, T. O., and Raushel, F. M. (1993) Kinetic destabilization of the hydroperoxy flavin intermediate by site-directed modification of the reactive thiol in bacterial luciferase, *J. Biol. Chem. 268*, 7699-7706.
45. Xin, X., Xi, L., and Tu, S. C. (1991) Functional consequences of site-directed mutation of conserved histidyl

residues of the bacterial luciferase alpha subunit, *Biochemistry 30*, 11255-11262.
46. Vervoort, J., Muller, F., O´Kayne, D., Lee, J., and Bacher, A. (1986) Bacterial luciferase: A carbon-13, nitrogen-15, and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance investigation, *Biochemistry 25*, 8067-8075.
47. Ahn, H. J., Yoon, H. J., Lee, B., II, and Suh, S. W. (2004) Crystal structure of chorismate synthase: a novel FMN-binding protein fold and functional insights, *J. Mol. Biol. 336*, 903-915.
48. Edmondson, D. E., Binda, C., and Mattevi, A. (2004) The FAD binding sites of human monoamine oxidases A and B, *Neurotoxicol. 25*, 63-72.
49. Hall, L. H., Bowers, M. L., and Durfor, C. N. (1987) Further consideration of flavin coenzyme biochemistry afforded by geometry-optimized molecular orbital calculations, *Biochemistry 26*, 7401-7409.
50. Xi, L., Cho, K. W., Herndon, M. E., and Tu, S. C. (1990) Elicitation of an oxidase activity in bacterial luciferase by site-directed mutation of a noncatalytic residue, *J. Biol. Chem. 265*, 4200-4203.
51. Huang, S., and Tu, S. C. (1997) Identification and characterization of a catalytic base in bacterial luciferase by chemical rescue of a dark mutant, *Biochemistry 36*, 14609-14615.
52. Acharya, P., Goenrich, M., Hagemeier, C. H., Demmer, U., Vorholt, J., Thauer R., K., and Ermler, U. (2004) How an enzyme binds the C1-carrier tetrahydromethanopterin: Structure of the tetrahydromethanopterin dependent formaldehyde-activating enzyme Fae from *Methylobacterium extorquens* AM1, *EMBO J. submitted*.
53. Sage, C. R., Rutenber, E. E., Stout, T. J., and Stroud, R. M. (1996) An essential role for water in an enzyme reaction mechanism: the crystal structure of the thymidylate synthase mutant E58Q, *Biochemistry 35*, 16270-16281.

V Diskussion

1. Substratbindestelle und Katalysemechanismus von Adf und Mer

Die Struktur der F_{420}-abhängigen Alkohol-Dehydrogenase (Adf) aus *Methanoculleus thermophilicus* wurde bei einer Auflösung von 1,8 Å ermittelt. Die TIM-Barrel-Konformation der Adf-Tertiärstruktur wurde in vorherigen Studien aufgrund von hoher Sequenzähnlichkeit (34 %) zu Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (Mer) und bakterieller Luciferase (LuxA) vorhergesagt (Berk 1999). Wie erwartet enthielt das kristallisierte Enzym F_{420} im aktiven Zentrum gebunden. In einem weiteren Anlauf wurde die Coenzym-Bindestelle von Mer bei einer Auflösung von 2,6 Å gelöst. Anhand der aus Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MetF) bekannten FAD-Bindestelle wurde die unbekannte Bindestelle im Bereich des C-terminalen Endes vermutet (Abbildung 5, Seite 12) (Shima *et al*. 2000). Allerdings wurden Interaktionen des Deazaflavins sowie Wechselwirkungen zu der nicht-Prolin-*cis*-Peptidbindung falsch vorhergesagt. Interessanterweise ist die Coenzym-F_{420}-Architektur in Adf und Mer bis auf wenige Ausnahmen identisch, obwohl beide Enzyme untereinander eine geringe Sequenzidentität zeigen (Tabelle 1, Seite 7). In den untersuchten Strukturen bindet Coenzym F_{420} in einer Tasche, welche 15 Å tief von der Oberfläche bis in das Zentrum des jeweiligen Enzyms hineinreicht.

Im Folgenden wird die Bindung von F_{420} für die untersuchten Enzyme gemeinsam zusammengefasst.

Die Bindestelle von Coenzym F_{420}. Der Deazaflavin-Ring von Coenzym F_{420} wird auf seiner *Re*-Seite von einer nicht-Prolin-*cis*-Peptidbindung gestützt. Diese seltene Peptidbindung verbindet Cystein 72 mit Isoleucin 73 in Adf und Glycin 61 und Isoleucin oder Valin 62 in Mer. In einer Zusammenstellung von Proteinen, welche nicht-Prolin-*cis*-Peptidbindungen in funktionell wichtigen Regionen aufweisen, wurden häufig angrenzende, aromatische Seitenketten-Interaktionen beobachtet. Stabilisierende Wechselwirkungen zwischen polaren Aminosäuren sind ebenfalls

möglich, kommen statistisch aber seltener vor (Jabs *et al*. 1999). Die *cis*-Bindung in Adf und Mer wird durch eine benachbarte, elektrostatische Wechselwirkung zwischen zwei konservierten Resten, Aspartat und Arginin, stabilisiert. Die optimale Positionierung der Carboxylatgruppe von Aspartat aus Strang β3 ermöglicht die Bindung mit einem Arginin aus Helix α4 und kompensiert so die energetisch ungünstige *cis*-Bindung (Abildung 4, Seite 36). Der Einsatz eines Prolin-Restes ermöglich die *cis*-Form der Peptidbindung mit einem geringeren Energieaufwand, doch würde Prolin den Deazaflavin-Ring des Coenzyms sterisch in seiner Position behindern. Diese Vorgabe könnte den Ausschluss von Prolin in dieser konservierten *cis*-Geometrie begründen.

Das als Isoalloxazin-Ring bezeichnete reaktive Ringsystem liegt gebogen über der beschriebenen *cis*-Bindung und weicht um 27° von einer planaren Konformation ab (Abbildung 3, Seite 46). Computersimulierte Berechnungen in Bezug auf energetisch günstige Konformationen des Deazaflavins deuten auf eine Präferenz der planaren Anordnung im oxidierten und auf eine gebogene Konformation im reduzieren Zustand hin (Hall *et al*. 1987). Aus Untersuchungen von Flavoproteinen ist bekannt, dass die Konformation Enzym-gebundener Flavine unter anderem durch schwache Wechselwirkungen oder sterische Zwänge von Resten der Polypeptidkette moduliert werden kann und dies die Reaktivität des Flavins beeinflusst (Thieme *et al*. 1981; Wierenga *et al*. 1983; Edmondson *et al*. 2004). Der Isoalloxazin-Ring wird in Mer und Adf über der *cis*-Bindung durch den sterischen Einfluss eines Imidazol-Ringes von Histidin und der Carboxylatgruppe eines Aspartats gekrümmt (Abbildung 5, Seite 37 und Abbildung 4, Seite 47). Hierbei favorisiert das reaktive C5 des Deazaflavin-Ringes eine sp3-Hybridisierung und kann dadurch mit einer geringeren Aktivierungsenergie reduziert werden. Dieser Effekt erleichtert auch die kovalente Bindung und Adduktbildung durch einen nukleophilen Angriff. Die Formation von Addukten wurde sowohl in Adf und Mer als auch in weiteren Flavoenzymen beobachtet (Binda *et al*. 2004; Edmondson *et al*. 2004).

Schwache Wechselwirkungen der Seitengruppe von F_{420} zu Amid-N- und Carbonyl-O-Atomen des Polypeptid-Rückgrades tragen ebenfalls zur Bindung des Coenzyms bei. Wenige der beteiligten Reste sind konserviert, da sich

Wasserstoffbrückenbindungen zwischen F_{420} und Hauptkettenatomen und die *cis*-Bindung in Adf und Mer von Seitenketten unabhängig ausbilden. Neben dem bereits genannten Histidin und Aspartat sind auch zwei an Wasserstoffbrückenbindungen beteiligte Glycinreste strukturell konserviert. Glycin zeichnet sich durch die Abwesenheit einer kohlenstoffhaltigen Seitenkette aus und verhindert in Adf und Mer eine Überschneidung der Phosphoribityl-enthaltende Seitengruppe von F_{420} mit angrenzenden Bereichen der Polypeptidmatrix.

Beide untersuchten Enzyme katalysieren eine Reduktion oder Oxidation von Coenzym F_{420} bzw. $F_{420}H_2$. Neben F_{420} sind 2-Propanol und Methylentetrahydromethanopterin (Methylen-H_4MPT) Substrate der Alkohol-Dehydrogenase bzw. der Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase. Die Bindestellen des sekundären Alkohols in Adf und von Methylen-H_4MPT in Mer wurden modelliert. Vorschläge zu möglichen Katalysemechanismen werden in den hier folgenden Abschnitten diskutiert.

Bindestelle von 2-Propanol in Adf und Katalysemechanismus. In F_{420}-abhängiger Alkohol-Dehydrogenase konnte Aceton als Teil eines gebundenen F_{420}-Addukts identifiziert werden (Abbildung 5, Seite 37). Das Keton bindet kovalent an C5 auf der *Si*-Seite des Deazaflavin-Ringes. Eine Erklärung für die Generierung der kovalenten Bindung ist der nukleophile Charakter von Aceton als Enolat-Tautomer (Abbildung 6, Seite 38). Die Bindung des Keto-O von Aceton im aktiven Zentrum erfolgt über Seitenreste von Histidin 39 und Glutamat 108. Histidin sowie Glutamat treten in Abhängigkeit des pK_S-Wertes sowohl als Wasserstoffbrückendonor als auch als Akzeptor auf, doch können ihre partiellen Ladungen und somit ihre katalytischen Rollen in Adf nur vermutet werden. In dem vorliegenden Modell protoniert Histidin als Säure-Katalysator das negativ geladene O-Atom von Aceton. Das gebundene Enol wird von Glutamat deprotoniert und als Enolat von Tryptophan 43, Glutamat 108 und Histidin 39 stabilisiert. Ein nukleophiler Angriff des negativ geladenen C1 des Enolat-Anions auf C5 des Deazaflavin-Rings führt zur Bildung des kovalenten Addukts im aktiven Zentrum. Die Bildung eines analogen NADP-Aceton-Addukts wurde bereits für eine NADP-abhängige Alkohol-Dehydrogenase über ein ähnliches Modell erklärt (Benach *et al*. 1999).

Mit Hilfe des Aceton-Addukts ist es möglich, 2-Propanol in das aktive Zentrum von F_{420}-abhängiger Alkohol-Dehydrogenase zu modellieren und einen katalytischen Mechanismus für Adf zu postulieren. Die Lage von Aceton als Teil des Addukts entspricht nicht direkt der Position von 2-Propanol im aktiven Zentrum. Der modellierte sekundäre Alkohol wird wie das Aceton über Wasserstoffbrückenbindungen des O-Atoms zu Tryptophan 43, Histidin 39 und Glutamat 108 koordiniert. Ferner befindet sich der Methyl-Rest C3 von 2-Propanol in Van-der-Waals-Abstand zu Phenylalanin 8, Glutamat 12, Aspartat 37, Histidin 39, Tryptophan 229, Tryptophan 246 und dem Isoalloxazin-Ring. Auf der anderen Seite interagiert C1 mit Phenylalanin 43, Tryptophan 229 und Cystein 249 (Abbildung 7).

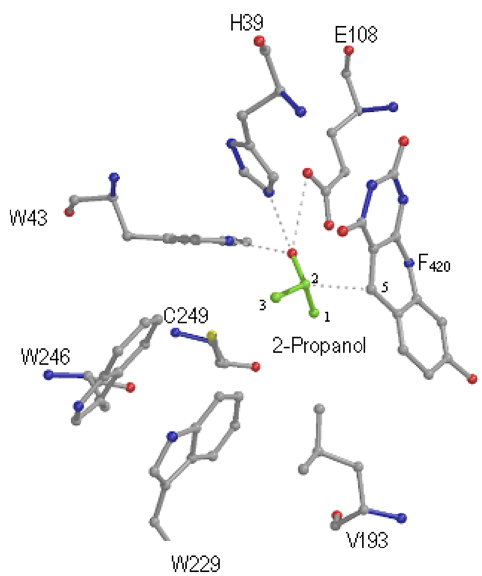


Abbildung 7: Modellierte Bindestelle von 2-Propanol im katalytischen Zentrum von Adf. Das Modell der 2-Propanol-Bindung (grün) basiert auf der Position von Aceton als Teil des kovalenten F_{420}-Addukts. Der sekundäre Alkohol wird an seiner Hydroxylgruppe über Wasserstoffbrückenbindungen zu Histidin 39, Glutamat 108 und Tryptophan 43 gebunden. Die Anordnung hydrophober Reste richtet den aktivierten Wasserstoff (H-Atom nicht dargestellt) des C2 auf das 2,9 Å-entfernte C5 des Deazaflavinringes.

Es ist bekannt, dass das Enzym 2-Propanol, 2-Butanol und 2-Pentanol, aber keine langkettigeren sekundären oder primären Alkohole oxidiert (Bleicher & Winter 1991). Diese Beobachtung stimmt mit der Anordnung der hydrophoben Reste, die noch einen weiteren Methylrest beherbergen könnten, überein. Die notwendige

Ausrichtung des aktivierten H-Atoms am C2 auf das elektrophile C5 des Coenyms mit Hilfe beider angrenzenden `Methyl-Anker´ erklärt die strikte Spezifität des Enzyms für sekundäre Alkohole. Ähnliche Prinzipien sind im aktiven Zentrum einer weiteren Alkohol-Dehydrogenase aus *Drosophila* beschrieben worden (Benach *et al*. 1999). Die Distanz von 2,9 Å zwischen C2 des Alkohols und des C5 ist optimal für den katalysierten Hydridtransfer (Almarsson & Bruice 1993).

Abbildung 8 beschreibt einen entsprechenden Vorschlag des Katalysemechanismus für Adf.

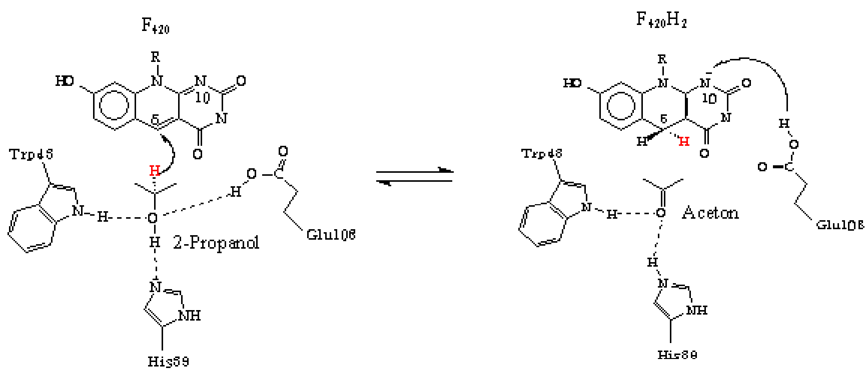


Abbildung 8: Vorgeschlagener Katalysemechanismus für Adf. Der Hydridtransfer erfolgt von 2-Propanol auf die *Si*-Seite (rot) des C5-Atoms von F_{420}. Als katalytische Base deprotoniert Histidin 39 die Hydroxylgruppe des Alkohols. Glutamat 108 und Tryptophan 43 dienen der Stabilisierung des Alkoholat-Anions und der Protonierung von N10. Die geordnete Reihenfolge von Coenzymbindung, ternärem Komplex und Dissoziation des Enzym-$F_{420}H_2$-Komplexes ist dem Katalysemechnismus der NAD-abhängigen Alkohol-Deydrogenase für die Umsetzung primärer und sekundärer Alkohole ähnlich (Theorell & Chance 1951).

Im binären Komplex wird Coenzym F_{420} im aktiven Zentrum von Adf gebunden. Die hydrophobe Bindetasche für 2-Propanol ermöglicht einen ungeladenen Zustand von Histidin 39 und Glutamat 108. Mit der Bindung von 2-Propanol deprotoniert Histidin 39 die Hydroxylgruppe des Alkohols und das intermediäre Alkoholat-Anion wird durch Seitenreste von Glutamat 108 und Tryptophan 43 stabilisiert. In einem ternären Komplex wird das an C2 aktivierte Hydrid-Ion direkt auf die *Si*-Seite von C5 des Deazaflavins transferiert. Die Nähe von 3,4 Å macht die Übertragung eines

Protons der Carboxylatgruppe von Glutamat 108 auf N10 des Deazaflavins möglich. Nach Ablauf der katalytischen Reaktion verlieren die aktiven Reste mit Hilfe von Wasser ihre partielle Ladung.

Weitere Möglichkeiten, eine alkoholische Hydroxylgruppe zu oxidieren, wurden mit Untersuchungen an einer großen Zahl von Alkohol-Dehydrogenasen, die sehr unterschiedliche Substratspezifitäten und physiologische Funktionen haben, beschrieben (Reid & Fewson 1994). In langkettigen NAD(P)-abhängigen Alkohol-Dehydrogenasen dient ein katalytisches Zink für die Stabilisierung des polarisierten Alkoholat-Intermediats, um so die Aktivierungsenergie für die Oxidation durch ein Histidin zu verringern (Eklund *et al*. 1976). Die katalytische Rolle von Tyrosin als Base, welche durch ein angrenzendes Glutamat verstärkt wird, wurde für Alkohol-Deyhdrogenase aus *Drosophila*, L-3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase und 15-Hydroxyprostaglandin-Dehydrogenase gezeigt (Ensor & Tai 1991; Barycki *et al*. 1999; Benach *et al*. 1999).

Bindestelle von Methylentetrahydromethanopterin in Mer und Katalyse-mechanismus. Obwohl Kokristallisationsansätze sowohl F_{420} als auch Methylentetrahydromethanopterin enthielten, wurde Methylen-H_4MPT nicht im aktiven Zentrum von Mer gebunden. Eine mögliche Erklärung wurde während der Verfeinerung der F_{420}-Position im Modell von Mer gefunden. Ein nicht identifizierbares Molekül bindet, ähnlich dem Aceton in Adf, kovalent am reaktiven Kohlenstoff des Deazaflavin-Ringes und könnte das Andocken des Pterinringes auf der *Si*-Seite des Coenzyms verhindern (Abbildung 3, Seite 46). Aufgrund der nun bekannten Bindung von F_{420}, der Stereochemie der katalysierten Reaktion und der optimalen Distanz für einen Hydridtransfer ist die ungefähre Lage des an N5 und N10 von H_4MPT koordinierten C14 und die Position des Pterin-Ringes vorgegeben. Die Koordinierung des Pterin-Ringes und die mögliche Lage des Aminobenzoat-enthaltenden Restes ist mit ausreichender Bestimmtheit vorhersagbar.

In Abbildung 9 (Seite 59) ist die Ansicht auf das modellierte Methylen-H_4MPT an der *Si*-Seite von reduziertem F_{420} gezeigt. Interessanterweise ist die Anordnung von Asparagin 176, Aspartat 96 und Glutamat 6 im aktiven Zentrum von Mer mit der

Position von Glutamin 183, Aspartat 120 und Glutamat 25 auf der *Si*-Seite von FAD in Methylentetrahydrofolat-Reduktase (MetF), dem analogen Enzym aus *Escherichia coli* (Guenther *et al*. 1999), trotz fehlender Sequenzverwandtschaft vergleichbar.

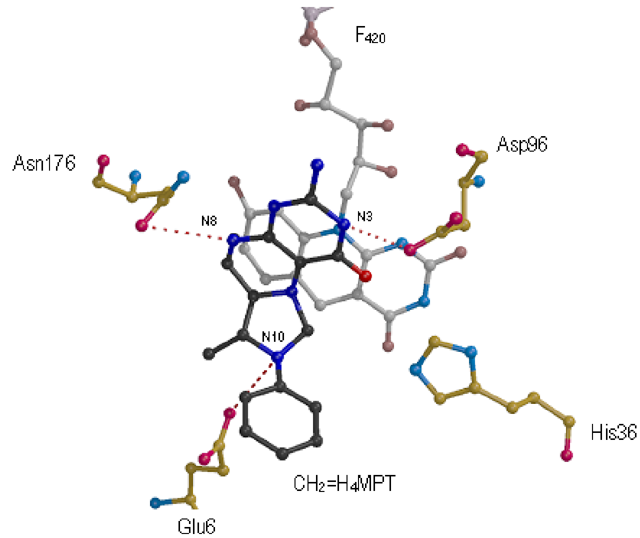


Abbildung 9: Modellierte Bindestelle von Methylentetrahydromethanopterin im katalytischen Zentrum von Mer. Die in Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (Mer) konservierten Reste Aspartat 96 und Asparagin 176 sind an der Bindung von Methylentetrahydromethanopterin (CH_2=H_4MPT, dunkelgrau) beteiligt. Glutamat 6 liegt 4 Å unterhalb von Stickstoff N10 und kann somit eine Rolle in der katalytischen Aktivierung von CH_2=H_4MPT einnehmen. Der Vorschlag ähnelt einem Interpretations-Modell für Methylentetrahydrofolat-Reduktase (Trimmer *et al*. 2001), dem analogen Enzym in Pro- und Eukaryoten.

Mutationsanalysen in MetF haben gezeigt, dass die drei konservierten Reste an der Bindung und an der Reduktion von Methylentetrahydrofolat (Abbildung 10, Seite 60) beteiligt sind (Trimmer *et al*. 2001). Schwache Wechselwirkungen zwischen der Carboxylatgruppe eines Aspartats und des N3 und Amino-N des Pterinringes wurden in Kristallstrukturen der Tetrahydrofolat-(H_4F)-bindenden Thymidylat-Synthase (Perry *et al*. 1993), Methylentetrahydrofolat-Dehydrogenase/Cyclohydrolase (Schmidt *et al*. 2000), der B_{12}-abhängigen Methionin-Synthase (Evans *et al*. 2004) und dem H_4MPT-abhängigen Formaldehyd-aktivierenden Enzym (Fae) aus *Methylobacterium* (Acharya *et al*. 2004) beschrieben.

Der Vergleich der Kristallstrukturen von Reduktase Mer mit und ohne gebundenem Coenzym liefert weitere Argumente für die Rolle von Aspartat 96 und Asparagin 176. Neben wenigen Neuordnungen von Seitenketten wird die Bindung von F_{420} von einer konformationellen Änderung der Helix α4-1 begleitet (Abbildung 1, Seite 45). Durch Wasserstoffbrückenbindung des Amid-N-Atoms der Aminosäure Glycin 95 und der Ribitolgruppe von F_{420} rückt die Carboxylatgruppe von dem benachbarten Aspartat 96 um 2,7 Å in die Nähe des Pyrimidinringes. Dieser Effekt kann die Fixierung des H_4MPT-Pterin-Ringes ermöglichen. Die Seitenkette von Asparagin 176 weist nach der Bindung von F_{420} einen erhöhten Temperaturfaktor auf und würde durch die Bindung von Methylen-H_4MPT über eine Wasserstoffbrücke fixiert werden (Abbildung 9, Seite 59). Die aus der Kristallstruktur von Fae bekannte Konformation von Methylen-H_4MPT führt allerdings zu einem geringen Abstand zwischen der Methylgruppe an C7a des Pterins und dem Hydroxybenzyl-Ring von F_{420} im aktiven Zentrum von Mer. Daher sind die Konformationen von Methylen-H_4MPT in Fae und Mer nicht zwingend identisch.

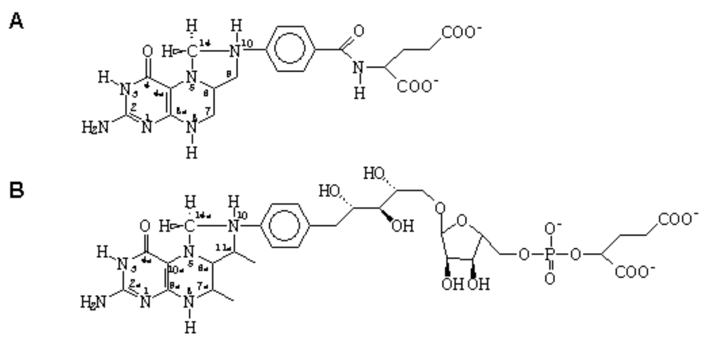


Abbildung 10: Methylentetrahydrofolat (A) und Methylentetrahydromethanopterin (B). Tetrahydrofolat (H_4F) besteht aus 6-Methylpterin, p-Aminobenzoat und Glutamat. Die Stickstoffe N5 und N10 sind an der Bindung von C14 der Methylengruppe beteiligt. H_4F ist strukturell verwandt mit Tetrahydromethanopterin (H_4MPT). Der C1-Carrier H_4MPT besteht aus 7-Methyl-6-ethylpterin, Aminobenzoyl, 1-Desoxyribose, Ribose, Phosphat und 2-Hydroxyglutarat.

Mit der Koordinierung des an der Katalyse beteiligten Pterins durch Aminosäuren der Stränge β1, β4 und β6 kommt der helicale Bereich α7-1 des Enzyms für die weitere H_4MPT-Bindung in Frage (Abbildung 1, Seite 45). Geringe

Unterschiede der Konformation der helicalen Segmente α7-1 bis α7-5 von Insertionsregion 3 wurde in allen Kristallstrukturen von Reduktase Mer beobachtet und könnten auf eine fehlende Stabilisierung durch Methylen-H_4MPT zurückzuführen sein (Shima *et al*. 2000). Eine Reorientierung der hydrophoben Seitenkette von Phenylalanin 231 in Helix α7-1 erlaubt der Benzylgruppe des C1-Carriers hydrophobe Wechselwirkungen. Ähnliche konformationelle Änderungen begleiten die Bindung von H_4MPT in Fae. In diesem Enzym wird der Benzol-Ring über zwei Phenylalanin-Reste koordiniert (Acharya *et al*. 2004). Die Exposition flexibler aromatischer Seitenketten ist ebenso aus weiteren H_4MPT-bindenden Enzymen wie Methenyl-H_4MPT-Cyclohydrolase (Grabarse *et al*. 1999) und Methylen-H_4MPT-Dehydrogenase (Ermler *et al*. 2002) bekannt. Für die Modellierung des Hydroxypentyl-Restes von H_4MPT leistet Polyethylenglycol, welches zwischen Resten von Helix α2 und α7-1 in der Stubstratbindetasche von Mer bindet, eine nützliche Hilfestellung. Möglicherweise erlaubt eine ähnliche Zusammensetzung des Polyethylenglycol-Moleküls ($C_{11}H_{24}O_6$) und der Hydroxypentylgruppe ($C_5H_7O_3$) diese unspezifische Bindung. Weitere Wechselwirkungen können nicht zugewiesen werden und sind für einen Vorschlag des Katalysemechanismus dieses Enzyms unerheblich.

Ein von Trimmer *et al*. postulierter Mechanismus für die Reduktion von Methylentetrahydrofolat in MetF (Trimmer *et al*. 2001) wird aufgrund der analogen Struktur des aktiven Zentrums und der strukturellen Verwandtschaft der Substrate für Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase in Betracht gezogen.

Dem Modell entsprechend wird der Pterin-Ring von H_4MPT auf der *Si*-Seite von F_{420} durch Aspartat 96 fixiert (Abbildung 11, Seite 62). Die maximale spezifische Enzymaktivität von Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase bei pH 7 (Ma & Thauer 1990b; Ma & Thauer 1990a; Ma *et al*. 1991) und Ergebnisse von Mutationsanalysen des analogen Aspartat-Restes in MetF (Trimmer *et al*. 2001) sprechen für einen ionisierten Zustand der Carboxylatgruppe. Die Substituierung von Glutamat 28 durch ortsgerichtete Mutagenese führt zu einer drastisch erniedrigten Aktivität von Methylentetrayhdrofolat-Reduktase. Die Untersuchung eines ähnlich positionierten Glutamat-Restes in Thymidylat-Synthase hat gezeigt, dass die Carboxylatgruppe nicht für die Bildung eines ternären Komplexes verantwortlich ist,

sondern aktivierte Wassermoleküle koordiniert (Sage *et al*. 1996). In Mer ist Glutamat 6 nicht weit von N10 des modellierten Methylentetrahydromethanopterin entfernt und kommt daher als Protonen-Donor in Frage (Abbildung 9, Seite 59).

Um die an H_4MPT gebundene Methylengruppe zu aktivieren, wird H_4MPT an N10 mit Hilfe von Glutamat 6 entweder direkt oder indirekt über aktivierte Wassermoleküle protoniert. Die nachfolgende Öffnung des Imidazol-Ringes führt zur Bildung eines 5-Iminium-Kations. Die negativ geladene Seitenkette von Aspartat 96 stabilisiert die entstehende positive Ladung des N5-Atoms über elektrostatische Wechselwirkungen. Auf diese Weise wird die Bildung des Übergangszustandes gestützt und die Aktivierungsenergie verringert. Die elektrophile Eigenschaft des N5-Atoms entzieht der exozyklischen Methylengruppe Elektronen und erleichtert den nachfolgenden direkten Hydridtransfer.

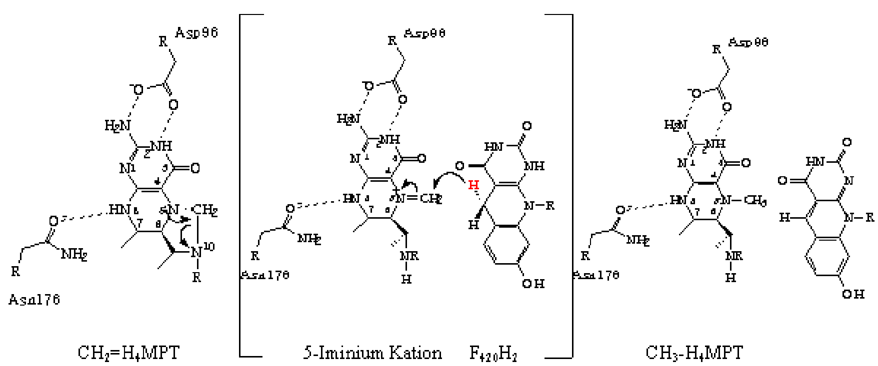


Abbildung 11: Vorgeschlagener Katalysemechanismus für Mer. Aspartat 96 und Asparagin 176 koordinieren den Pterin-Ring von Methylentetrahydromethanopterin ($CH_2=H_4MPT$). Die Protonierung von N10 führt zur Bildung eines intermediären 5-Iminium-Kations. Die aktivierte C1-Gruppe wird durch den *Si*-Seiten-spezifischen Hydridtransfer (rot) von reduziertem Coenzym F_{420} ($F_{420}H_2$) zu Methyltetrahydromethanopterin (CH_3-H_4MPT) reduziert.

Die Frage nach dem katalytischen Mechanismus ist für das Enzym Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase nicht abschließend geklärt. In diesem Zusammenhang wäre die Ermittlung der H_4MPT-Bindestelle nicht nur für die Struktur-Funktions-Analyse von Mer, sondern auch für eine mögliche Bindung von H_4F in MetF äußerst aufschlussreich. Obwohl Mer und MetF beide einen Hydridtransfer von

einem Flavinderivat auf eine an einem Pterin-Ring gebundene C1-Gruppe katalysieren und eine ähnliche Tertiärstruktur teilen, kann die Existenz von zwei verschiedenen Katalysemechanismen nicht ausgeschlossen werden. Es wäre unter anderem denkbar, dass Histidin 36 als Protonen-Donor agiert, da es eine vergleichbar Nähe zu N10 des C1-Carriers aufweist wie Glutamat 6 (Abbildung 9, Seite 59).

2. Modellierung von FMN in die Kristallstruktur von bakterieller Luciferase

In der von bakterieller Luciferase (LuxA) katalysierten Oxidation von reduziertem FMN ($FMNH_2$) und Aldehyd wird freie Energie in Form von blau-grünem Licht (λ = 490 nm) emittiert (Abbildung 12).

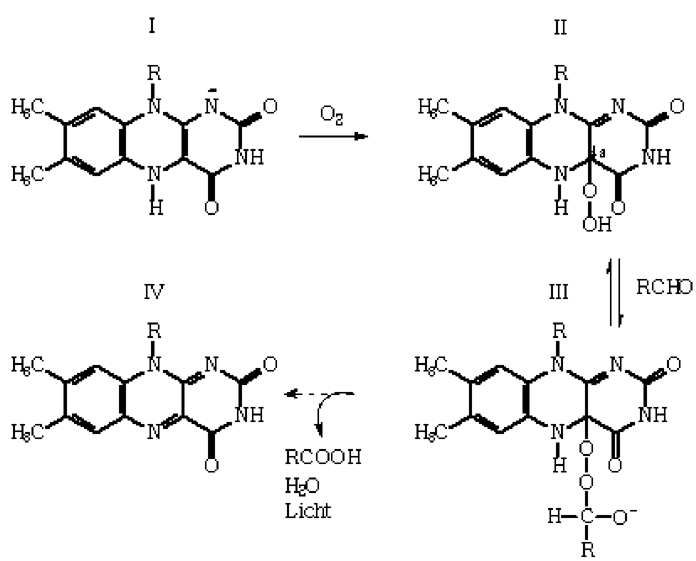


Abbildung 12: Vereinfachte Darstellung der Reaktion von LuxA. In der bakteriellen Luciferase (LuxA) reagiert reduziertes FMN ($FMNH_2$) (I) mit molekularem Sauerstoff (O_2) zu einem 4a-Hydroperoxy-FMN-Intermediat (II) (Baldwin *et al.* 1979). Der aktivierte Sauerstoff reagiert mit Aldehyd (RCHO) über ein Hydroperoxy-Hemiacetal-Intermediat (III) zu der entsprechenden Fettsäure (RCOOH), Wasser (H_2O), oxidiertem FMN und Licht (IV) (Macheroux *et al.* 1993).

Essentielle Reste, die an der Substratbindung und an der Katalyse dieser faszinierenden Reaktion beteiligt sind, wurden mit Hilfe von ortsgerichteter

Mutagenese identifiziert, jedoch fehlen für ein Verständnis der Struktur-Funktions-Beziehung die Bindestellen des Coenzyms und des langkettigen Aldehydsubstrates. Die Ermittlung der Coenzym-Position in zwei F_{420}-abhängigen Mitgliedern der LuxA-Familie ermöglicht nun eine von Computer-Simulationen und Mutationsanalysen (Lin *et al*. 2001) unabhängige Vorhersage der FMN-Bindestelle in der vorliegenden Tertiärstruktur von LuxA (Fisher *et al*. 1995; Fisher *et al*. 1996).

Die mit den wenigsten Abweichungen berechnete Überlagerung (Superposition) der Tertiärstrukturen von F_{420}-abhängiger Alkohol-Dehydrogenase (Adf), Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (Mer) und LuxA führt direkt über Substitution der F_{420}-Position durch FMN zur Konformation des Coenzyms in LuxA (Abbildung 5, Seite 48). Die auf dieser Grundlage basierenden Interaktionen von FMN werden in Abbildung 13 schematisch dargestellt.

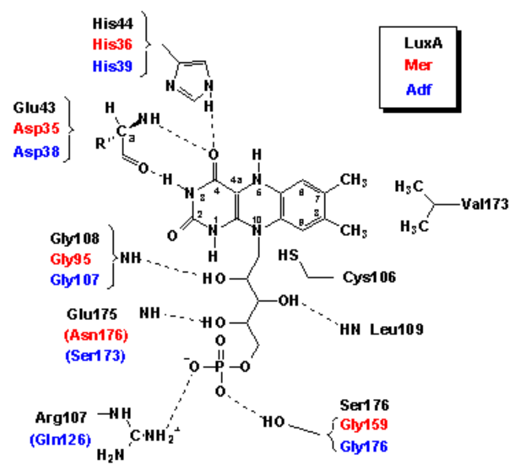


Abbildung 13: Modellierter Komplex von FMN mit Resten von LuxA auf Basis der F_{420}-Bindestellen in Adf und Mer. Schwache Wechselwirkungen sind als gestrichelte Linien dargestellt. Die Ala74 und Ala75 verbindende nicht-Prolin-*cis*-Peptidbindung ist nicht gezeigt. Reste, die in Adf (blau), Mer (rot) und LuxA strukturell konserviert sind und identische funktionelle Rollen haben, sind mit einer Klammer zusammengefasst. Reste, die innerhalb des Komplexes unterschiedlich wechselwirken, sind in Klammern geschrieben. Der Austausch von Serin (Ser176 in LuxA) gegen Glycin (Adf und Mer) stellt ein mögliches Unterscheidungsmerkmal FMN- und F_{420}-bindender Mitglieder innerhalb der LuxA-Familie dar. Aufgrund der kohlenstoffhaltigen Seitenkette würde Serin in Adf und Mer sterisch mit F_{420} interferieren.

Um die Modellierung des Coenzyms zu ermöglichen, wurden zwei geringfügige konformationelle Änderungen in Seitenketten von Histidin 44 und Leucin 109 postuliert.

Das konservierte Histidin ist die einzige konservierte Aminosäure in allen drei Enzymen, deren Seitenkette in die Bindung des Coenzyms oder die Katalyse involviert ist (Abbildung 2, Seite 45). Die Substituierung des Histidins durch ortsgerichtete Mutagenese führte zu einer drastischen erniedrigten Biolumineszenz-Aktivität von Luciferase. Ferner stieg der K_m-Wert für reduziertes FMN um ein Vielfaches an (Xin *et al*. 1991; Huang & Tu 1997). Über intermolekulare Wechselwirkungen kann der Imidazol-Ring sowohl die Pyrimidingruppe binden als auch den gesamten Isoalloxazin-Ring von FMN aus seiner planaren Anordnung zwingen oder eine andere Rolle im bisher unbekannten Katalysemechanismus einnehmen. Das Auftreten eines essentiellen und instabilen 4a-Hydroperoxy-Intermediates nach Angriff von molekularem Sauerstoff am Kohlenstoff C4a des Flavins (Hastings *et al*. 1973) korreliert ebenfalls mit der Nähe (4 Å) des Histidin-Imidazol-Ringes zu C4a. Demnach müsste die Katalyse, wie zuvor vermutet (Wada *et al*. 1999), auf der *Si*-Seite des Isoalloxazin-Ringes stattfinden.

Es konnte gezeigt werden, dass der ortsgerichtete Austausch von Cystein 106 zu einer verminderten Oxidation des Aldehydsubstrates und zu einer Destabilisierung des zuvor genannten Übergangszustandes führt (Xi *et al*. 1990; Abu-Soud *et al*. 1993). Die durch die Mutation verursachten sterischen Zwänge störten die Geometrie der *cis*-Bindung und verhinderten möglicherweise indirekt die erforderliche Konformation des Isoalloxazin-Ringes und hatten somit eine verminderten Stabilität des 4a-Hydroperoxyintermediates als Folge (Lin *et al*. 2002). Die aus Adf und Mer bekannte gebogene Konformation des Isoalloxazin-Ringes wurde für die Modellierung von FMN in LuxA übernommen. Die auf der *Re*-Seite liegende *cis*-Peptidbindung wirkt wie ein Amboss, über welchem der Flavin-Ring in die optimale Konformation gezwungen wird. Jegliche Änderung der *cis*-Konformation beeinflusst automatisch die Konformation des Flavin-Ringes und stimmt daher mit der Interpretation der Cystein-Mutante überein. Auch Valin 173 könnte durch hydrophobe Wechselwirkungen mit den Methyl-Substituenten des Flavin-Ringes an der

Krümmung beteiligt sein, da der Austausch dieses Restes zu einer Verschiebung des Emissionsspektrums führt (Lin *et al*. 2004). Überraschenderweise existiert in LuxA, im Vergleich zu Adf und Mer, keine offensichtliche intramolekulare Wechselwirkung, die für die Stabilisierung der *cis*-Peptidbindung wichtig sein könnte. In diesem Zusammenhang ist eine vergleichbare FMN-Bindung über eine nicht-Prolin-*cis*-Peptidbindung in Flavodoxin erwähnenswert, zumal unterschiedliche Redoxzustände des Flavins mit einer Isomerisierung der *cis*-Peptidbindung in Verbindung gebracht wurden (Ludwig *et al*. 1997).

Mit der Bindung eines anorganischen Phosphat-Ions (Fisher *et al*. 1995) und durch nachfolgende Mutagenese (Moore *et al*. 1999; Lin *et al*. 2001) wurde Arginin 107 in LuxA eine Rolle für die Bindung der Phosphatgruppe von FMN zugesprochen. Wie in Abbildung 13 (Seite 64) zu sehen ist, bindet Arginin 107 die Phosphatgruppe über ionische Wechselwirkungen. Der mutagene Austausch gegen eine neutrale oder negativ geladene Aminosäure führt daher zum Verlust dieser Wechselwirkung.

Frühere Modelling-Studien des binären Luciferase-Komplexes basieren auf der Kenntnis der Phosphat-Bindestelle und einer Docking-Simulation unter Berücksichtigung von Bindungsenergien und geometrischen Abständen der Atome (Lin *et al*. 2001). Das damalige Modell bindet den planaren Flavin-Ring unter anderem über eine Wasserstoffbrückenbindung an den Amid-N von Alanin 75 und weicht damit substantiell in der Konformation von FMN und in der Rolle der *cis*-Peptidbindung von diesem Modell ab (Abbildung 5, Seite 48). Eine planare Flavin-Ring-Konformation in LuxA wurde bereits zuvor postuliert (Vervoort *et al*. 1986) und darf deshalb, trotz gegenteiliger Beobachtungen in den Strukturen von Adf und Mer, für eine zukünftige Analyse des Katalysemechanismus nicht unberücksichtigt bleiben.

3. Vergleich der F_{420}-Bindestelle in Mer und Adf mit der in $F_{420}H_2$:NADP-Oxidoreduktase und in 8-HDF-Photolyase

In der Aminosäuresequenz der bekannten F_{420}-abhängigen Oxidoreduktasen ist kein allgemein gültiges Motiv für die Bindung von Coenzym F_{420} erkennbar. Innerhalb der LuxA-Familie jedoch ist die Vorhersage der F_{420}- bzw. FMN-Position auch für weitere Vertreter wie zum Beispiel die F_{420}-abhängige Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus pathogenen *Mycobacteria* möglich (Abbildung 2, Seite 34). Wie in der Einleitung erwähnt, sind alle untersuchten F_{420}-abhängigen Oxidoreduktasen *Si*-Seiten-spezifisch in Bezug auf das C5-Atom des Deazaflavins (Thauer 1997). Ein Vergleich der Bindestelle von F_{420}-abhängigen Vertretern der bakteriellen Luciferase-Familie mit der von $F_{420}H_2$:NADP-Oxidoreduktase (Fno) (Warkentin *et al*. 2001) zeigt, wie das Coenzym unterschiedlich koordiniert wird und warum der Hydrid-Transfer in beiden Fällen ausschließlich auf die *Si*-Seite erfolgen kann.

$F_{420}H_2$:NADP-Oxidoreduktase liegt als Homodimer vor. Die N-terminale Domäne der Monomere besitzt eine Faltung, wie sie typisch für Dinukleotid-Bindedomänen ist. Aufgrund der Tertiärstruktur überrascht es nicht, dass die Bindung von NADP analog zu Mitgliedern der Gruppe NADP-bindender Enzyme erfolgt (Carugo & Argos 1997). Das Enzym bindet F_{420} über eine Wasserstoffbrückenbindung des Hydroxybenzyl-Ringes mit dem Amid-N und Carbonyl-O eines C-terminalen Leucins und über hydrophobe Interaktionen auf der *Re*-Seite des Isoalloxazin-Ringes (Abbildung 14, Seite 68). Im Gegensatz zu Adf und Mer ist F_{420} in Fno auf die Bindung von NADP angewiesen, an welches es auf seiner *Si*-Seite über Van-der-Waals-, aromatische und polare Wechselwirkungen bindet.

Sowohl die Dinukleotid-Bindedomäne von Fno als auch die kaum vorhandenen direkten Interaktionen von F_{420} mit Polypeptidresten verdeutlichen, dass Fno in erster Linie eine NADP-abhängige Oxidoreduktase ist, welche F_{420} als Substrat über NADP kooperativ bindet. Darüber hinaus sind intermolekulare Wechselwirkungen beider Substrate für eine vergleichsweise schwache Biegung des Isoalloxazin-Ringes über hydrophobe Seitenketten von Threonin und Leucin auf der *Re*-Seite verantwortlich.

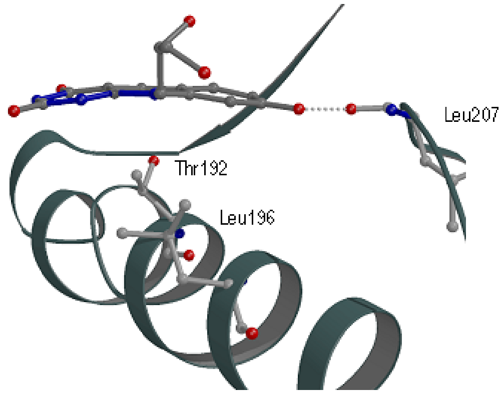


Abbildung 14: Wechselwirkungen von Coenzym F_{420} in Fno (Warkentin *et al*. 2001). Der Deazaflavin-Ring wird auf seiner *Re*-Seite von Threonin 192 und Leucin 196 flankiert. Die Wasserstoffbrücke zu Leucin 207 stellt den einzigen direkten Kontakt zwischen F_{420} und dem Enzym dar. Extensive Wechselwirkungen zu NADP, das auf der *Si*-Seite von F_{420} bindet, sind nicht gezeigt.

Die Koordinierung von 8-Hydroxydeazaflavin in 8-HDF-Photolyase (Phr) unterscheidet sich deutlich von der Bindung in F_{420}-abhängigen Oxioreduktasen (Abbildung 15, Seite 69).

8-Hydroxydeazaflavin dient als Licht-absorbierendes Chromophor in Phr aus methanogenen Archaea (Kiener *et al*. 1989), nicht methanogenen halophilen Archaea (Takao *et al*. 1989), *Streptomyces* (Eker *et al*. 1981), in manchen Grünalgen (Eker *et al*. 1988) und konnte in der Kristallstruktur von Phr aus *Anacystis nidulans,* einem Cyanobakterium, als F_{420}-Derivat F0 spezifiziert werden (Tamada *et al*. 1997). Das photoreaktivierende Enzym bindet an Pyrimidin-Dimere eines DNA-Stranges. Nach Absorption von Licht mittels F0 wird die Energie mittels Dipol-Dipol-Interaktionen auf ein Enzym-gebundenes FAD-Molekül übertragen, welches das Pyrimidin-Dimer mittels Ein-Elektronen-Transfer spaltet (Malhotra *et al*. 1992).

F0 sitzt tief in einem Spalt innerhalb der N-terminalen Domäne eines Monomers. Sowohl die *Re*- als auch die *Si*-Seite des planar-gebundenen Isoalloxazin-Ringes ist durch hydrophobe und aromatische Seitenketten abgeschirmt und nur für Solvens erreichbar (Abbildung 15, Seite 69). Dies ist möglich, da der interchromophore Energietransfer keinen direkten Kontakt zwischen FAD und F0

benötigt. Des weiteren wird das Deazaflavin über polare Interaktionen der Ribitolgruppe mehrfach fixiert. Der Bindung von F0 in Phr ist für die Effizienz des Energietransfers kritisch (Tamada *et al*. 1997). Die optimale Ausrichtung des Chromophors könnte die vielen intermolekularen Kontakte zu Deazaflavin in 8-HDF-Photolyase erklären.

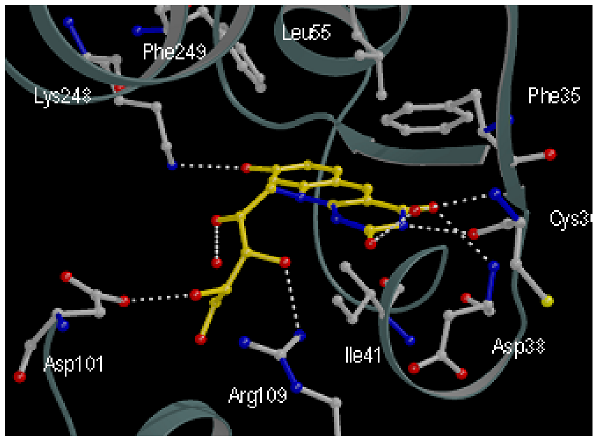


Abbildung 15: Bindestelle des Licht-absorbierenden 8-Hydroxydeazaflavin-Cofaktors in Photolyase von *Anacystis nidulans* (Tamada *et al*. 1997). Sowohl die *Re*- als auch die *Si*-Seite des planar-gebundenen Isoalloxazin-Ringes ist durch hydrophobe und aromatische Seitenketten abgeschirmt und nur für Solvens erreichbar. Zwei Wassermoleküle (rot), welche an F0 (gelb) binden sind auch dargestellt.

Zusammenfassend sind die Fixierung des reaktiven mittleren Ringes auf der *Re*-Seite durch hydrophobe Reste oder durch eine *cis*-Peptidbindung und die Biegung des flankierenden Hydroxybenzyl- und Pyrimidin-Ringes auf die *Re*-Seite von F_{420} die sterischen Gründe für den *Si*-Seiten-spezifischen Hydridtransfer in Mer, Adf und Fno. Eine generelle Erklärung für die einheitliche Stereospezifität F_{420}-abhängiger Oxidoreduktasen kann anhand der strukturellen Befunde nicht gegeben werden. Die Bindung des Deazaflavin-haltigen Cofaktors erfolgt in den bisher untersuchten Strukturen von F_{420}-abhängigen Oxidoreduktasen und von 8-HDF-Photolyase, außerhalb der LuxA-Familie gemäß der jeweiligen Aufgabe des Cofaktors (F_{420} bzw. F0) unterschiedlich. Es ist zu erkennen, dass sich in der Evolution verschiedene Strategien entwickelt haben, um das Coenzym zu binden.

VI Literaturverzeichnis

Abrahams JP, Leslie AGW (1996) Methods used in the structure determination of bovine mitochondrial F-1 ATPase. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **52**:30-42

Abu-Soud HM, Clark AC, Francisco WA, Baldwin TO, Raushel FM (1993) Kinetic destabilization of the hydroperoxy flavin intermediate by site-directed modification of the reactive thiol in bacterial luciferase. *J Biol Chem* **268**:7699-7706

Acharya P, Goenrich M, Hagemeier CH, Demmer U, Vorholt J, Thauer RK, Ermler, U (2004) How an enzyme binds the C1-carrier tetrahydromethanopterin: Structure of the tetrahydromethanopterin dependent formaldehyde-activating enzyme Fae from *Methylobacterium extorquens* AM1. *EMBO Journal,* submitted

Alex LA, Reeve JN, Orme-Johnson WH, Walsh CT (1990) Cloning, sequence determination, and expression of the genes encoding the subunits of the nickel-containing 8-hydroxy-5-deazaflavin reducing hydrogenase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* DH. *Biochemistry* **29**:7237-7244

Almarsson Ö, Bruice TC (1993) Evaluation of the factors influencing reactivity and stereospecificity in NAD(P)H dependent dehydrogenase enzymes. *J. Am. Chem. Soc*. **115**: 2125-2138

Baldwin TO, Ziegler MM (1992) Chemistry and Biochemistry of Flavoproteins. *CRC Press, Boca Raton,* 467-530

Baldwin TO, Ziegler MM, Powers DA (1979) Covalent structure of subunits of bacterial luciferase: NH_2-terminal sequence demonstrates subunit homology. *Proc Natl Acad Sci U S A* **76**:4887-4889

Banner DW, Bloomer AC, Petsko GA, Phillips DC, Pogson CI, Wilson IA, Corran PH, Furth AJ, Milman JD, Offord RE, Priddle JD, Waley, SG (1975) Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 angström resolution using amino acid sequence data. *Nature* **255**:609-614

Barycki JJ, O'Brien LK, Bratt JM, Zhang R, Sanishvili R, Strauss A, Banaszak LJ (1999) Biochemical characterization and crystal structure determination of human heart short chain L-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase provide insights into catalytic mechanism. *Biochemistry* **38**:5786-5798

Bäumer S, Murakami E, Brodersen J, Gottschalk G, Ragsdale SW, Deppenmeier U (1998) The $F_{420}H_2$:heterodisulfide oxidoreductase system from *Methanosarcina* species. 2-Hydroxyphenazine mediates electron transfer from $F_{420}H_2$ dehydrogenase to heterodisulfide reductase. *FEBS Lett* **428**:295-298

Benach J, Atrian S, Gonzalez-Duarte R, Ladenstein R (1999) The catalytic reaction and inhibition mechanism of *Drosophila* alcohol dehydrogenase: observation of an enzyme-bound NAD-ketone adduct at 1.4 Å resolution by X-ray crystallography. *J Mol Biol* **289**:335-355

Berk H (1999) F_{420} und NADP-abhängige Alkohol-Dehydrogenasen und $F_{420}H_2$:NADP-Oxidoreduktasen aus methanogenen Archaea: Struktur und Stereospezifität. *Dissertation, Philipps-Universität Marburg an der Lahn*

Binda C, Hubalek F, Li M, Herzig Y, Sterling J, Edmondson DE, Mattevi, A (2004) Crystal structures of monoamine oxidase B in complex with four inhibitors of the N-propargylaminoindan class. *J Med Chem* **47**:1767-1774

Bleicher K, Winter J (1991) Purification and properties of F_{420}- and NADP(+)-dependent alcohol dehydrogenases of *Methanogenium liminatans* and *Methanobacterium palustre*, specific for secondary alcohols. *Eur J Biochem* **200**:43-51

Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254

Breitung J, Börner G, Scholz S, Linder D, Stetter KO, Thauer RK (1992) Salt dependence, kinetic properties and catalytic mechanism of *N*-formylmethanofuran:tetrahydromethanopterin formyltransferase from the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*. *Eur J Biochem* **210**:971-981

Brunger AT Adams, PD, Clore GM, DeLano WL, Gros P,Grosse-Kunstleve RW, Jiang JS, Kuszewski J, Nilges M, Pannu NS, Read RJ, Rice LM, Simonson T, Warren GL (1998) Crystallography & NMR system: A new software suite for macromolecular structure determination. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **54**:905-921

Carugo O, Argos P (1997) NADP-dependent enzymes. II: Evolution of the mono- and dinucleotide binding domains. *Proteins* **28**:29-40

Cheeseman P, Toms-Wood A, Wolfe RS (1972) Isolation and properties of a fluorescent compound, factor 420 , from *Methanobacterium* strain M.o.H. *J Bacteriol* **112**:527-531

Collaborative Computational Project N (1994) The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography. *Acta Cryst D* **50**:760-763

Daniels L, Bakhiet N, Harmon K (1985) Widespread distribution of a 5-deazaflavin cofactor in actinomycetes and related bacteria. *Systematic & Applied Microbiology* **6**:12-17

Davies DR, Segal DM (1971) Protein crystallization: microtechniques involving vapor diffusion. *Methods Enzymol* **22**:266-269

De La Fortelle E, Bricogne G (1997) Maximum likelihood heavy-atom parameter refinement for multiple isomorphous replacement and multiwavelength anomalous diffraction methods. *Methods Enzymol* **276**:472-494

de Wit LEA, Eker APM (1987) 8-Hydroxy-5-deazaflavin-dependent electron transfer in the extreme halophile *Halobacterium cutirubrum*. *FEMS (Federation of European Microbiological Societies) Microbiology Letters* **48**:121-125

DiMarco AA, Bobik TA, Wolfe RS (1990) Unusual coenzymes of methanogenesis. *Annu Rev Biochem* **59**:355-394

Edmondson DE, Binda C, Mattevi A (2004) The FAD binding sites of human monoamine oxidases A and B. *Neurotoxicology* **25**:63-72

Eirich LD, Dugger RS (1984) Purification and properties of an F_{420}-dependent NADP reductase from *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Biochim Biophys Acta* **802**:80-86

Eirich LD, Vogels GD, Wolfe RS (1978) Proposed structure for coenzyme F_{420} from *Methanobacterium*. *Biochemistry* **17**:4583-4593

Eker AP, Dekker RH, Berends W (1981) Photoreactivating enzyme from *Streptomyces griseus*-IV. On the nature of the chromophoric cofactor in *Streptomyces griseus* photoreactivating enzyme. *Photochem Photobiol* **33**:65-72

Eker AP, Hessels JK, Meerwaldt R (1989) Characterization of an 8-hydroxy-5-deazaflavin:NADPH oxidoreductase from *Streptomyces griseus*. *Biochim Biophys Acta* **990**:80-86

Eker AP, Kooiman P, Hessels JK, Yasui A (1990) DNA photoreactivating enzyme from the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *J Biol Chem* **265**:8009-8015

Eker AP, Hessels JKC, van den Velde J (1988) Photoreacting enzyme from green algae *Scendesmus acutus*. Evidence for the presence of two different flavin chromophores. *Biochemistry* **27**:1758-1765

Eklund H, Nordstrom B, Zeppezauer E, Soderlund G, Ohlsson I, Boiwe T, Soderberg BO, Tapia O, Branden CI, Akeson A (1976) Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* **102**:27-59

Ensor CM, Tai HH (1991) Site-directed mutagenesis of the conserved tyrosine 151 of human placental NAD(+)-dependent 15-hydroxyprostaglandin dehydrogenase yields a catalytically inactive enzyme. *Biochem Biophys Res Commun* **176**:840-845

Ermler U, Hagemeier CH, Roth A, Demmer U, Grabarse W, Warkentin E, Vorholt JA (2002) Structure of methylene-tetrahydromethanopterin dehydrogenase from *Methylobacterium extorquens* AM1. *Structure (Camb)* **10**:1127-1137

Esnouf RM (1997) An extensively modified version of MOLSCRIPT that includes greatly enhanced coloring capabilities. *J Mol Graph* **15**:133-138

Evans JC, Huddler DP, Hilgers MT, Romanchuk G, Matthews RG, Ludwig ML (2004) Structures of the N-terminal modules imply large domain motions during catalysis by methionine synthase. Proc Natl Acad Sci U S A **101**: 3729-3736

Fisher AJ, Raushel FM, Baldwin TO, Rayment I (1995) Three-dimensional structure of bacterial luciferase from Vibrio harveyi at 2.4 Å resolution. *Biochemistry* **34**:6581-6586

Fisher AJ, Thompson TB, Thoden JB, Baldwin TO, Rayment I (1996) The 1.5-Å resolution crystal structure of bacterial luciferase in low salt conditions. *J Biol Chem* **271**:21956-68

Gloss LM, Hausinger RP (1987) Reduction potential characterization of methanogen factor 390. *FEMS Microbiol. Lett* **48**:143-145

Gorris LGM, van der Drift C (1994) Cofactor contents of methanogenic bacteria reviewed. *Biofactors* **4**:139-145

Grabarse W, Vaupel M, Vorholt JA, Shima S, Thauer RK, Wittershagen A, Bourenkov G, Bartunik HD, Ermler U (1999) The crystal structure of methenyltetrahydromethanopterin cyclohydrolase from the hyperthermophilic archaeon *Methanopyrus kandleri. Structure Fold Des* **7**:1257-1268

Guenther BD, Sheppard CA, Tran P, Rozen R, Matthews RG, Ludwig ML (1999) The structure and properties of methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli* suggest how folate ameliorates human hyperhomocysteinemia. *Nat Struct Biol* **6**:359-365

Hagemeier CH, Shima S, Thauer RK, Bourenkov G, Bartunik HD, Ermler U (2003) Coenzyme F_{420}-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase (Mtd) from *Methanopyrus kandleri*: a methanogenic enzyme with an unusual quarternary structure. *J Mol Biol* **332**:1047-1057

Hall LH, Bowers ML, Durfor CN (1987) Further consideration of flavin coenzyme biochemistry afforded by geometry-optimized molecular orbital calculations. *Biochemistry* **26**:7401-7409

Hastings JW, Balny C, LePeuch C, Douzou P (1973) Spectral properties of an oxygenated luciferase flavin intermediate isolated by low-temperature chromatography. *Proc Natl Acad Sci U S A* **70**:3468

Heiss G, Hofmann KW, Trachtmann N, Walters DM, Rouviere P, Knackmuss HJ (2002) npd gene functions of *Rhodococcus (opacus) erythropolis* HL PM-1 in the initial steps of 2,4,6-trinitrophenol degradation. *Microbiology* **148**:799-806

Holm L, Sander C (1993) Secondary structure comparison by alignment of distance matrices. *J Mol Biol* **233**:123-138

Huang S, Tu SC (1997) Identification and characterization of a catalytic base in bacterial luciferase by chemical rescue of a dark mutant. *Biochemistry* **36**:14609-14615

Jabs A, Weiss MS, Hilgenfeld R (1999) Non-proline *cis*-peptide bonds in proteins. *J Mol Biol* **286**:291-304

Jacobson F, Walsh C (1984) Properties of 7,8-didemethyl-8-hydroxy-5-deazaflavins relevant to redox coenzyme function in methanogen metabolism. *Biochemistry* **23**:979-988

Jancarik J, Kim S-H (1991) Sparse matrix sampling: A screening method for crystallization of proteins. *J Appl Crystallogr* **24**:409-411

Jones TA, Zou JY, Cowan SW, Kjeldgaard (1991) Improved methods for building protein models in electron density maps and the location of errors in these models. *Acta Crystallography Section A-Foundations in Crystallography* **47**:110-119

Kabsch W, Sander C (1983) Dictionary of protein secondary structure: pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features. *Biopolymers* **22**:2577-2637

Karrasch M, Bott M, Thauer RK (1989) Carbonic anhydrase activity in acetate grown *Methanosarcina barkeri*. *Arch Microbiol* **151**:137-142

Kiener A, Husain I, Sancar A, Walsh C (1989) Purification and properties of *Methanobacterium thermoautotrophicum* DNA photolyase. *J Biol Chem* **264**:13880-13887

Kissinger CR, Gehlhaar DK, Fogel DB (1999) Rapid automated molecular replacement by evolutionary search. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **55**:484-491

Klein AR, Berk H, Purwantini E, Daniels L, Thauer RK (1996) *Si*-face stereospecificity at C5 of coenzyme F_{420} for F_{420}-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis* and F_{420}-dependent alcohol dehydrogenase from *Methanoculleus thermophilicus*. *Eur J Biochem* **239**:93-97

Klein AR, Thauer RK (1995) *Re*-face specificity at C14a of methylenetetrahydromethanopterin and *Si*-face specificity at C5 of coenzyme F_{420} for coenzyme F_{420}-dependent methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase from methanogenic Archaea. *Eur J Biochem* **227**:169-174

Kleywegt GJ, Jones TA (1996) xdlMAPMAN and xdlDATAMAN - programs for reformatting, analysis and manipulation of biomacromolecular electron-density maps and reflection data sets. *Acta Crystallographica Section D-Biological Crystallography* **52**:826-828

Kraulis PJ (1991) MOLSCRIPT: a program to produce both detailed and schematic plots of protein structures. *J Appl Cryst* **24**:946-950

Kumar S, Tsai CJ, Nussinov R (2000) Factors enhancing protein thermostability. *Protein Eng* **13**:179-191

Kunow J, Schworer B, Setzke E, Thauer RK (1993a) *Si*-face stereospecificity at C5 of coenzyme F_{420} for F_{420}-dependent N^5,N^{10}-methylenetetrahydromethanopterin dehydrogenase, F_{420}-dependent N^5,N^{10}-methylenetetrahydromethanopterin reductase and $F_{420}H_2$:dimethyl-naphthoquinone oxidoreductase. *Eur J Biochem* **214**:641-646

Kunow J, Schwörer B, Stetter KO, Thauer RK (1993b) A F_{420}-dependent NADP reductase in the extremely thermophilic sulfate-reducing *Archaeoglobus fulgidus*. *Arch Microbiol* **160**:199-205

Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685

Levitt DG (2001) A new software routine that automates the fitting of protein X-ray crystallographic electron-density maps. *Acta Crystallog sect D* **57**:1013-1019

Li H, Xu H, Graham DE, White RH (2003) Glutathione synthetase homologs encode alpha-L-glutamate ligases for methanogenic coenzyme F_{420} and tetrahydrosarcinapterin biosyntheses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:9785-9790

Lin LY, Sulea T, Szittner R, Kor C, Purisima EO, Meighen EA (2002) Implications of the reactive thiol and the proximal non-proline *cis*-peptide bond in the Structure and function of *Vibrio harveyi* luciferase. *Biochemistry* **41**:9938-9945

Lin LY, Sulea T, Szittner R, Vassilyev V, Purisima EO, Meighen EA (2001) Modeling of the bacterial luciferase-flavin mononucleotide complex combining flexible docking with structure-activity data. *Protein Sci* **10**:1563-1571

Lin LY, Szittner R, Friedman R, Meighen EA (2004) Changes in the kinetics and emission spectrum on mutation of the chromophore-binding platform in *Vibrio harveyi* luciferase. *Biochemistry* **43**: 3183-3194

Lin XL, White, RH (1986) Occurrence of coenzyme F_{420} and its gamma-monoglutamyl derivative in nonmethanogenic archaebacteria. *Journal of Bacteriology* **168**:444-448

Ludwig ML, Pattridge KA, Metzger AL, Dixon MM, Eren M, Feng, Y. Swenson RP (1997) Control of oxidation-reduction potentials in flavodoxin from *Clostridium beijerinckii:* the role of conformation changes. *Biochemistry* **36**:1259-1280

Ma K, Linder D, Stetter KO, Thauer RK (1991) Purification and properties of N^5,N^{10}-methylenetetrahydromethanopterin reductase (coenzyme F_{420}-dependent) from the extreme thermophile *Methanopyrus kandleri*. *Arch Microbiol* **155**:593-600

Ma K, Thauer RK (1990a) N^5,N^{10}-Methylenetetrahydromethanopterin reductase from *Methanosarcina barkeri*. *FEMS Microbiol Lett* **70**:119-124

Ma K, Thauer RK (1990b) Purification and properties of N^5,N^{10}-methylene-tetrahydromethanopterin reductase from *Methanobacterium thermo-autotrophicum* (strain Marburg). *Eur J Biochem* **191**:187-193

Ma K, Thauer RK (1990c) Single step purification of methylenetetrahydromethan-opterin reductase from *Methanobacterium thermo-autotrophicum* by specific binding to blue sepharose CL-6B. *FEBS Lett* **268**:59-62

Malhotra K, Kim ST, Walsh C, Sancar, A (1992) Roles of FAD and 8-hydroxy-5-deazaflavin chromophores in photoreactivation by *Anacystis nidulans* DNA photolyase. *J Biol Chem* **267**:15406-15411

Macheroux P, Ghisla S, Hastings JW (1993) Spectral detection of an intermediate preceding the excited state in the bacterial luciferase reaction. *Biochemistry* **32**:14183-14186

Merritt EA, Murphy MEP (1994) Raster3D Version 2.0 - A program for photorealistic molecular graphics. *Acta Crystallogr A* **50**:869-873

Moore C, Lei B, Tu SC (1999) Relationship between the conserved alpha subunit arginine 107 and effects of phosphate on the activity and stability of *Vibrio harveyi* luciferase. *Arch Biochem Biophys* 370:**45**-50

Naraoka T, Mamoi K, Fukasawa K, Goto M (1984) Isolation and identification of a naturally occurring 7,8, didemethyl-8-hydroxy-5-deazariboflavin derivative from *Mycobacterium avium*. *Biochim Biophys Acta* **797**:377-386

Navaza J (1994) AMoRe - an automated package for molecular replacement. *Acta Crystallography Section A-Foundations in Crystallography* **50**:157-163

Otwinowski Z, Minor W (1997) Processing of X-raydiffraction data collected in the oscillation mode. *Method Enzymol* **276**:307-326

Perry KM, Carreras CW, Chang LC, Santi DV, Stroud RM (1993) Structures of thymidylate synthase with a C-terminal deletion: role of the C-terminus in alignment of 2'-deoxyuridine 5'-monophosphate and 5,10-methylenetetrahydrofolate. *Biochemistry* **32**:7116-7125

Peschke U, Schmidt H, Zhang HZ, Piepersberg W (1995) Molecular characterization of the lincomycin-production gene cluster of *Streptomyces lincolnensis* 78-11. *Mol Microbiol* **16**:1137-1156

Purwantini E, Daniels L (1998) Molecular analysis of the gene encoding F_{420}-dependent glucose-6-phosphate dehydrogenase from *Mycobacterium smegmatis*. *J Bacteriol* **180**:2212-2219

Reid MF, Fewson CA (1994) Molecular characterization of microbial alcohol dehydrogenases. *Crit Rev Microbiol* **20**:13-56

Sage CR, Rutenber EE, Stout TJ, Stroud RM (1996) An essential role for water in an enzyme reaction mechanism: the crystal structure of the thymidylate synthase mutant E58Q. *Biochemistry* **35**:16270-16281

Schauer NL, Ferry JG, Honek JF, Orme-Johnson WH, Walsh C (1986) Mechanistic studies of the coenzyme F_{420}-reducing formate dehydrogenase from *Methanobacterium formicicum*. *Biochemistry* **25**:7163-7168

Schmidt A, MacKenzie RE, Chen VJ, Bewly JR, Ray JE, Toth JE, Cygler M (2000) Structures of three inhibitor complexes provide insight into the reaction mechanism of the human methylenetetrahydrofolate dehydrogenase/cyclohydrolase. *Biochemistry* **39**:6325-6335

Schmitz RA, Linder D, Stetter KO, Thauer RK (1991) N^5,N^{10}-Methylenetetrahydromethanopterin reductase, coenzyme F_{420}-dependent and formylmethanofuran dehydrogenase from the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. *Arch Microbiol* **156**:427-434

Schönheit P, Moll J, Thauer RK (1980) Growth parameters (K_S, μ_{max}, Y_S) of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* **127**:59-65.

Schwede T, Kopp J, Guex N, Peitsch MC (2003) SWISS-MODEL: An automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res* **31**:3381-3385

Sheldrick GM (1995) Structure solution by iterative peaklist optimization and tangent expansion in space goup P1. *Acta Crystallog sect B* **51**:423-431

Sheldrick GM (1998) Applications to Macromolecules. *Direct Methods for Solving Macromolecular Structures. Kluwer Academic Publishers*, 401-412

Sheppard CA, Trimmer EE, Matthews RG (1999) Purification and properties of NADH-dependent N^5-,N^{10}-methylenetetrahydrofolate reductase (MetF) from Escherichia coli. *J Bacteriol* **181**:718-725

Shima S, Warkentin E, Grabarse W, Sordel M, Wicke M, Thauer RK, Ermler U (2000) Structure of coenzyme F_{420}-dependent methylenetetrahydromethanopterin reductase from two methanogenic archaea. *J Mol Biol* **300**:935-950

Sumner JS, Matthews RG (1992) Stereochemistry and mechanism of hydrogen transfer between NADPH and methylenetetrahydrofolate in the reaction catalyzed by methylenetetrahydrofolate reductase from pig liver. *J Am Chem Soc* **114**:6949-6956

Takao M, Kobayashi T, Oikawa A, Yasui A (1989) Tandem arrangement of photolyase and superoxide dismutase genes in *Halobacterium halobium*. *J Bacteriol* **171**:6323-6329

Tamada T, Kitadokoro K, Higuchi Y, Inaka K, Yasui A, de Ruiter PE, Eker AP, Miki K (1997) Crystal structure of DNA photolyase from *Anacystis nidulans*. *Nat Struct Biol* **4**:887-891

te Brommelstroet BW, Hensgens CM, Keltjens JT, van der Drift C, Vogels GD (1990) Purification and properties of 5,10-methylenetetrahydromethanopterin reductase, a coenzyme F_{420}-dependent enzyme, from *Methanobacterium thermoautotrophicum* strain delta H. *J Biol Chem* **265**:1852-1857

Teshima T, Nakai S, Shiba T, Tsai L, Yamazaki J (1985) Elucidation of Stereospecificity of a selenium-containig hydrogenase from *Methanococcus vannielii* - Syntheses of (R)- and S-[4-H1]-3,4-dihydro-7-hydroxy-1-hydroxyethylquinolinone. *Tetrahedron Lett* **26**:351-354

Thauer RK (1997) Biodiversity and unity in biochemistry. *Antonie Van Leuwenhoek* **71**:21-32

Theorell H, Chance B (1951) Studies on liver alcohol dehydrogenase II. The kinetics of the compound of horse liver alcohol dehydrogenase and reduced diphosphopyridine nucleotide. *Acta Chem Scand* **5**:1127-1144

Thieme R, Pai EF, Schirmer RH, Schulz GE (1981) Three-dimensional structure of glutathione reductase at 2 Å resolution. *J Mol Biol* **152**:763-782

Trimmer EE, Ballou DP, Ludwig ML, Matthews RG (2001) Folate activation and catalysis in methylenetetrahydrofolate reductase from *Escherichia coli*: roles for aspartate 120 and glutamate 28. *Biochemistry* **40**:6216-6226

Vermeij P, van der Steen RJ, Keltjens JT, Vogels GD, Leisinger T (1996) Coenzyme F_{390} synthetase from *Methanobacterium thermoautotrophicum* Marburg belongs to the superfamily of adenylate-forming enzymes. *J Bacteriol* **178**:505-510

Vervoort J, Muller F, O´Kayne D, Lee J, Bacher A (1986) Bacterial luciferase: A carbon-13, nitrogen-15, and phosphorus-31 nuclear magnetic resonance investigation. *Biochemistry* **25**:8067-8075

Vorholt J, Kunow J, Stetter KO, Thauer RK (1995) Enzymes and coenzymes of the carbon monoxide dehydrogenase pathway for autotrophic CO_2 fixation in *Archaeoglobus lithotrophicus* and the lack of carbon monoxide dehydrogenase in the heterotrophic *A. profundus*. *Arch Microbiol* **163**:112-118

Vorholt JA, Hafenbradl D, Stetter KO, Thauer RK (1997) Pathways of autotrophic CO_2 fixation and of dissimilatory nitrate reduction to N_2O in *Ferroglobus placidus*. *Arch Microbiol* **167**:19-23

Wada N, Sugimoto T, Watanabe H, Tu SC (1999) Computational analysis of the oxygen addition at the C4a site of reduced flavin in the bacterial luciferase bioluminescence reaction. *Photochem Photobiol* **70**:116-122

Walsh C (1996) Naturally occurring 5-deazaflavin coenzymes: Biological redox roles. *Acc Chem Res* **19**:216-221

Warkentin E, Mamat B, Sordel-Klippert M, Wicke M, Thauer RK, Iwata M, Iwata S, Ermler U, Shima S (2001) Structures of $F_{420}H_2$:$NADP^+$ oxidoreductase with and without its substrates bound. *EMBO Journal* **20**:6561-6569

Widdel F (1986) Growth of methanogenic bacteria in pure culture with 2-propanol and other alcohols as hydrogen donors. *Appl Environ Microbiol* **51**:1056-1062

Widdel F, Wolfe RS (1989) Expression of secondary alcohol dehydrogenase in methanogenic bacteria and purification of the F_{420}-specific enzyme from *Methanogenium thermophilum* strain TCI. *Arch Microbiol* **152**:322-328

Wierenga RK, Drenth J, Schulz GE (1983) Comparison of the three-dimensional protein and nucleotide structure of the FAD-binding domain of p-hydroxybenzoate hydroxylase with the FAD- as well as NADPH-binding domains of glutathione reductase. *J Mol Biol* **167**:725-739

Wohlfarth G, Diekert G (1991) Thermodynamics of methylenetetrahydrofolate reduction to methyltetrahydrofolate and its implications for the energy metabolism of homoacetogenic bacteria. *Arch Microbiol* **155**:378-381

Xi L, Cho KW, Herndon ME, Tu SC (1990) Elicitation of an oxidase activity in bacterial luciferase by site-directed mutation of a noncatalytic residue. *J Biol Chem* **265**:4200-4203

Xin X, Xi L, Tu SC (1991) Functional consequences of site-directed mutation of conserved histidyl residues of the bacterial luciferase alpha subunit. *Biochemistry* **30**:11255-11262

Yamazaki S, Tsai L, Stadtman TC, Jacobson FS, Walsh C (1980) Stereochemical studies of 8-hydroxy-5-deazaflavin-dependent $NADP^+$ reductase from *Methanococcus vannielii. J Biol Chem* **255**:9025-9027

Yamazaki S, Tsai L, Stadtman TC, Teshima T, Nakaji A, Shiba T (1985) Stereochemical studies of a selenium-containing hydrogenase from *Methanococcus vannielii*: determination of the absolute configuration of C-5 chirally labeled dihydro-8-hydroxy-5-deazaflavin cofactor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**:1364-1366

You KS (1985) Stereospecificity for nicotinamide nucleotides in enzymatic and chemical hydride transfer reactions. *CRC Crit Rev Biochem* **17**:313-451

Zecchinon L, Claverie P, Collins T, D'Amico S, Delille D, Feller G, Georlette D, Gratia E, Hoyoux A, Meuwis MA, Sonan G, Gerday C (2001) Did psychrophilic enzymes really win the challange ? *Extremophiles* **5**:313-321

Publikationsliste

Smirnova A, Li H, Weingart H, Aufhammer S, Burse A, Finis K, Schenk A, Ullrich MS (2001) Thermoregulated expression of virulence factors in plant-associated bacteria. *Arch Microbiol* **176**: 393-399

Smirnova A, Aufhammer S, Ullrich MS (2003) Strain-specific sequence alterations in the gene encoding the histidine protein kinase might be responsible for temperature-dependent production of the phytotoxine coronatine by *Pseudomonas syringae*. *Pseudomonas syringae and related pathogens, Kluwer Academic Publishers*, 383-391

Aufhammer SW, Warkentin E, Berk H, Shima S, Thauer RK, Ermler U (2004) Coenzyme binding in F_{420}-dependent secondary alcohol dehydrogenase, a member of the bacterial luciferase family. *Structure* **12**:361-370.

Aufhammer SW, Warkentin E, Ermler U, Hagemeier CH, Thauer RK, Shima S Crystal structure of Mer in complex with coenzyme F_{420}: Architecture of F_{420}/FMN-binding sites of enzymes within the non-prolyl *cis*-peptide containing bacterial luciferase subfamily. *Biochemistry*, eingereicht

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Stephan W. Aufhammer
Geburtstag:	23.04.1975
Geburtsort:	Bonn
Familienstand:	ledig

Schulausbildung

1982 - 1986	Grundschule, Kirchheim unter Teck
1986 - 1995	Schloßgymnasium, Kirchheim unter Teck
6/1995	Abitur (gut)

Zivildienst

7/1995 - 7/1996	Zivildienst am Institut für Landschaftsökologie und Umweltschutz (NABU), Bühl

Studium

10/1996 - 9/1998	Grundstudium im Fach Biologie (Diplom) an der Universität Rostock; Abschluß 1998 Vordiplom (gut)
10/1998 - 10/2000	Hauptstudium im Fach Biologie (Diplom) an der Universität Marburg; Abschluß 2001 Diplom (sehr gut)
11/2000 - 8/2001	Anfertigung der Diplomarbeit am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie unter der Anleitung von Dr. Ullrich in der Abteilung von Professor Thauer. Thema: Topologische Charakterisierung von CorS, einer Histidin-Proteinkinase aus *Pseudomonas syringae*
9/2001 - 11/2001	Mitarbeiter an der Technischen Universität Hamburg-Harburg in der Abteilung von Professor Antranikian
seit 11/2001	Promotion am Max-Planck-Institut für terrestrische Mikrobiologie unter der Anleitung von Dr. Shima in der Abteilung von Professor Thauer in Zusammenarbeit mit Dr. Ermler am Max-Planck-Institut für Biophysik (DFG-Stipendium des Graduiertenkollegs „Proteinfunktion auf atomarer Ebene“).

Dank

Mein besonderer Dank gilt den Herren Professor Dr. Rudolf K. Thauer und Dr. Seigo Shima für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die Überlassung der interessanten Themenstellung, für viele Anregungen und die stetige Diskussionsbereitschaft. Herrn Professor Dr. Matthias Ullrich möchte ich nachträglich für seine Unterstützung während und nach der Diplomarbeit danken.

Außerordentlich dankbar bin ich auch den Herren PD Dr. Ulrich Ermler und Dr. Eberhard Warkentin vom Max-Planck-Institut für Biophysik in Frankfurt, die mir die Begeisterung für Kristallstrukturen nahe gebracht haben und mit welchen ich die spannensten Augenblicke der Strukturlösung in Frankfurt, Hamburg und Grenoble erleben durfte.

Für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit danke ich der DFG für ein Stipendium im Graduiertenkolleg *Proteinfunktion auf atomarer Ebene* unter Leitung von Herrn Professor Dr. Wolfgang Buckel.

Herrn Dr. Christoph Hagemeier gilt mein Dank für die Diskussion und Hilfestellungen in Marburg während meines gesamten Aufenthalts in der Arbeitsgruppe.

Gleichermaßen danke ich den Herren Dr. Manfred Irmler, Reinhard Böcher und Jörg Kahnt für die Hilfe bei computertechnischen Fragen bzw. die Einführung in die HPLC-Analyse und Frau Dr. Erica Lyon und Frau Monika Schmidt für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Für die freundliche Assistenz während der Laborarbeiten bin ich Frau Melanie Sordel-Klippert, Herrn Jürgen Koch, Frau Manuela Kauß, Frau Johanna Moll und Frau Stefanie Lindow sehr dankbar.

Außerdem danke ich allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Thauer, Shima, Hedderich und Ermler für die nette Atmosphäre im Labor.

Bei meiner Freundin Gila bedanke ich mich dafür, dass ich mich immer freuen konnte, nach Hause zu kommen,

Mein größter und abschließender Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung diese Arbeit nie hätte entstehen können

Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich meine Dissertation mit dem Titel

„Kristallstrukturen von F_{420}-abhängiger Alkohol-Dehydrogenase (Adf) und F_{420}-abhängiger Methylentetrahydromethanopterin-Reduktase (Mer)“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Ort, Datum Unterschrift